

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Isabela Garbazza Vieira

**O IMPACTO DA DIETA E DA MICROBIOTA NA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE
À INFECÇÃO POR UMA BACTÉRIA MULTIRRESISTENTE**

BELO HORIZONTE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Isabela Garbazza Vieira

**O IMPACTO DA DIETA E DA MICROBIOTA NA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE
À INFECÇÃO POR UMA BACTÉRIA MULTIRRESISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Thomaz Vieira
Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Gil

BELO HORIZONTE

2024

043

Vieira, Isabela Garbazza.

O impacto da dieta e da microbiota na resposta do hospedeiro frente à infecção por uma bactéria multirresistente [manuscrito] / Isabela Garbazza Vieira. – 2024.

82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Thomaz Vieira. Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Gil.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Microbiota. 3. Dieta. 4. *Drosophila melanogaster*. 5. *Klebsiella pneumoniae*. 6. Resistência Microbiana a Medicamentos. I. Vieira, Angélica Thomaz. II. Ferreira, Álvaro Gil Araújo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELA GARBAZZA VIEIRA. Aos onze dias do mês de março de 2024 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O impacto da dieta e da Microbiota na resposta do Hospedeiro frente à Infecção por uma Bactéria Multirresistente", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Angélica Thomaz Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. José Henrique Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovada; Dr. Isaque João da Silva de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira (Fiocruz- MG), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 11 de março de 2024.

Dr. José Henrique Oliveira (UFSC)



Documento assinado digitalmente

Jose Henrique Maia Campos de Oliveira

Data: 19/03/2024 10:55:06-0300

CPF: ***.946.997-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dr. Isaque João da Silva de Faria (UFMG)

Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira (Fiocruz- MG)

Dra. Angélica Thomaz Vieira - Orientadora (UFMG)

Prof. Fabiola Mara Ribeiro
 Coordenadora do Programa de Pós-graduação
 Em Bioquímica e Imunologia

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio e incentivo que, desde sempre, serviram de alicerce para as minhas realizações.

Ao Estêvão, pela paciência e pelo companheirismo quando tudo se mostrava tão difícil.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à professora Angélica Thomaz Vieira, pela orientação e por ter me acolhido em seu laboratório, proporcionando-me as condições necessárias para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos queridos colegas do Laboratório de Microbiota e Imunomodulação (LMI), pela parceria, pelas colaborações e por todos os desafios que enfrentamos juntos: Anna Carolina, Clênio Cruz, Izabela Galvão, Laiza Martins e Viviani Mendes.

Ao Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABIO), por todo o suporte e disponibilidade para a realização desse trabalho, pelas risadas e parceria: professor Flaviano Martins, Bruno Gallotti, Fernanda Carvalho, Lara Campos e Pâmella Damásio.

Ao professor João Trindade Marques, por ter cedido gentilmente as moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, linhagem selvagem Canton-S utilizada nesse trabalho.

A todos que cruzaram meu caminho durante minha trajetória no Mestrado e contribuíram para que essa jornada fosse mais leve e feliz: meu eterno muito obrigada!

Nada a temer senão o correr da luta.
Nada a fazer senão esquecer o medo.

RESUMO

A resistência bacteriana a antimicrobianos emergiu como uma das principais ameaças à saúde pública do século XXI. O uso indiscriminado de antibióticos é o principal fator para a resistência antimicrobiana, e os esforços para limitar sua utilização não têm produzido os resultados esperados. Considerando que a modulação da microbiota através da dieta pode ajudar no controle de infecções, e tendo como base as interações existentes entre a microbiota e o hospedeiro, bem como a importância da patogênese causada pela *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, o presente trabalho tem como objetivo principal elucidar o papel da dieta e da microbiota intestinal durante uma infecção bacteriana causada pela *K. pneumoniae* multirresistente. Para isto, a *Drosophila melanogaster* foi utilizada como modelo experimental, com intuito de reduzir a complexidade das interações existentes entre microbiota, hospedeiro e patógeno e permitir a compreensão do papel microbiota na resposta do hospedeiro frente a estas infecções. Moscas selvagens infectadas com a bactéria *K. pneumoniae* foram submetidas a dietas que mimetizavam tanto dietas ocidentais, caracterizadas pelo alto teor de gorduras e açúcares simples quanto a dieta mediterrânea, qualificada pelo alto teor de fibras. Foi avaliada a taxa de sobrevivência e o perfil da composição da microbiota do intestino e da carcaça das moscas. Os resultados mostraram que as moscas infectadas com bactéria resistente, quando submetidas às dietas ocidentais, apresentaram alterações importantes na taxa de sobrevivência e na composição da microbiota quando comparadas com as moscas alimentadas com dieta mediterrânea, indicando que a interação entre a dieta e a microbiota apresenta um impacto na resolução ou na progressão da infecção. Nesse sentido, estratégias de modulação da microbiota por meio da dieta podem ser de grande valia como estratégias terapêuticas alternativas e/ou adjuvantes no tratamento de doenças infecciosas.

Palavras-chave: microbiota, dieta, *Drosophila melanogaster*, *Klebsiella pneumoniae*, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials has emerged as one of the main public health threats of the 21st century. The indiscriminate use of antibiotics is the main factor behind antimicrobial resistance, and efforts to limit their use have not produced the expected results. Considering that modulation of the microbiota through diet can help control infections, and based on the interactions that exist between the microbiota and the host, as well as the importance of the pathogenesis caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, the present work has as its main objective to elucidate the role of diet and intestinal microbiota during a bacterial infection caused by multidrug-resistant *K. pneumoniae*. For this, *Drosophila melanogaster* was used as an experimental model, with the aim of reducing the complexity of the interactions between microbiota, host and pathogen and allowing the understanding of the microbiota's role in the host's response to these infections. Wild flies infected with the bacteria *K. pneumoniae* were subjected to diets that mimicked both Western diets, characterized by a high content of fats and simple sugars; as for the Mediterranean diet, characterized by its high fiber content. The survival rate and the profile of the microbiota composition of the intestine and carcass of the flies were evaluated. The results showed that flies infected with resistant bacteria, when subjected to Western diets, presented important changes in the survival rate and microbiota composition when compared to flies fed a Mediterranean diet, indicating that the interaction between the diet and the microbiota presents an impact on the resolution or progression of the infection. In this sense, strategies for modulating the microbiota through diet can be of great value as alternative therapeutic strategies and/or adjuvants in the treatment of infectious diseases.

Keywords: microbiota, diet, *Drosophila melanogaster*, *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fatores envolvidos na propagação da resistência aos antibióticos nos setores: medicina humana na comunidade e no hospital, produção animal e agricultura, e meio ambiente.....15
- Figura 2:** Mortes globais, por patógenos, atribuíveis e associadas à resistência bacteriana aos antimicrobianos, 2019.....16
- Figura 3:** Uma visão geral dos principais componentes nutricionais que modulam a microbiota intestinal e o sistema imunológico.....18
- Figura 4:** Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Inseto holometábolo, com o estágio de embrião, três instares larvais, estágios de pupa e forma adulta.....21
- Figura 5:** Uma comparação da anatomia macroscópica do trato gastrointestinal, composição da microbiota intestinal e arquitetura epitelial intestinal geral entre *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*.....22
- Figura 6:** Desenho esquemático da anatomia de *Drosophila melanogaster* com foco no trato digestivo.....23
- Figura 7:** Técnicas de infecção em *Drosophila*.....26
- Figura 8:** Dieta padrão de *Drosophila* - formulação de Bloomington.....30
- Figura 9:** Delineamento do experimento de padronização da dieta rica em fibra para a *D. melanogaster* e dosagem do Acetato, um AGCC.....32
- Figura 10:** *Drosophila melanogaster* submetida à High Fat Diet, a uma temperatura acima de 25°C.....34
- Figura 11:** *Drosophila melanogaster* submetida à dieta Ketogenic, a uma temperatura de 25°C.....35
- Figura 12:** Desenho esquemático da infecção oral em *Drosophila*.....39
- Figura 13:** Delineamento experimental para avaliação da sobrevivência das moscas.....43

Figura 14: Delineamento experimental para avaliação da microbiota do intestino e da carcaça da <i>Drosophila melanogaster</i> após infecção oral com <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente.....	44
Figura 15: Delineamento experimental para avaliação do efeito do tempo de infecção oral na microbiota do intestino e da carcaça da <i>Drosophila melanogaster</i> após infecção com <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente.....	45
Figura 16: Caracterização e avaliação do impacto das dietas no percentual de sobrevivência de moscas machos e fêmeas.....	47
Figura 17: Contagem de CFU no intestino e na carcaça de moscas machos e fêmeas submetidas às diferentes dietas durante 7 dias.....	49
Figura 18: Caracterização do consumo alimentar e da abundância relativa da microbiota do intestino e da carcaça de moscas machos e fêmeas.....	52
Figura 19: Percentual de sobrevivência de machos não infectados e infectados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> B31e submetidos às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic.....	54
Figura 20: Percentual de sobrevivência de fêmeas não infectadas e infectadas com <i>Klebsiella pneumoniae</i> B31e submetidas às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic.....	56
Figura 21: Correlação entre o percentual de sobrevivência de fêmeas não infectadas e infectadas com <i>Klebsiella pneumoniae</i> B31e submetidas às dietas Standard, High Fat e Ketogenic, e a contagem de CFU no intestino em diferentes pontos do tempo.....	60
Figura 22: Avaliação da sobrevivência das moscas após introdução das dietas Standard, High Fat e Ketogenic associadas à infecção oral por <i>Klebsiella pneumoniae</i> não resistente.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informação nutricional da dieta Standard.....	36
Tabela 2: Informação nutricional da dieta High Fiber.....	36
Tabela 3: Informação nutricional da dieta High Sucrose.....	37
Tabela 4: Informação nutricional da dieta High Fat.....	37
Tabela 5: Informação nutricional da dieta Ketogenic.....	37
Tabela 6: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.....	41
Tabela 7: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.....	41
Tabela 8: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.....	41
Tabela 9: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.....	42
Tabela 10: Comparação da atmosfera, tempo de incubação e microorganismos alvo dos meios de cultura utilizados para avaliar carcaça e intestino das moscas.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitros

g – grama

G - força G

mL – mililitros

MRS - do inglês, De Man, Rogosa and Sharpe

MYP - do inglês, Mannitol-Yeast extract-Peptone

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

Pool – combinação de duas amostras de intestino ou carcaça

RPM – rotações por minuto

UFC – unidades formadoras de colônia

ST - Standard Diet

HF - High Fiber Diet

HS - High Sucrose Diet

FAT - High Fat Diet

KETO - Ketogenic Diet

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos.....	14
1.2 A dieta como modulador entre a microbiota intestinal afetando os mecanismos de defesa do hospedeiro.....	17
1.3 <i>Drosophila</i> como um modelo animal experimental para decifrar os mecanismos de modulação da microbiota.....	20
1.3.1 Aspectos Gerais.....	20
1.3.2 Morfologia e anatomia da mosca.....	21
1.3.3 Microbiota da mosca.....	23
1.3.4 Estudo de infecção em mosca.....	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Estoque e manutenção da <i>Drosophila melanogaster</i>	30
4.2 Padronização das dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic em laboratório.....	30
4.2.1 Comparação do conteúdo nutricional das dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic.....	36
4.3 Ensaio de consumo alimentar.....	38
4.4 Bactérias e condições de cultivo.....	38
4.5 Infecção oral.....	39
4.6 Análise de sobrevivência (lifespan).....	40
4.7 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (CFU)	40

4.7.1 Técnica de microbiota cultivada.....	40
4.7.2 Meios de cultura bacteriológica.....	41
4.8 Estratégia experimental I (lifespan).....	43
4.9 Estratégia experimental II (microbiota cultivada do intestino e da carcaça)	44
4.10 Estratégia experimental III (cinética da infecção).....	45
4.11 Análise estatística.....	45
5.RESULTADOS.....	46
5.1 As diferentes composições dietéticas impactam na sobrevivência (lifespan) das moscas.....	46
5.2 As diferentes composições dietéticas afetam a composição da microbiota das <i>Drosophilas</i> que diferem quantitativamente entre macho e fêmea.....	49
5.3 <i>Drosophilas</i> alimentadas com dietas High Fat ou Ketogenic apresentaram maior susceptibilidade à infecção oral causada pela bactéria multirresistente <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
5.4 Análise da cinética de modulação da microbiota das <i>Drosophilas</i> durante a infecção oral causada pela bactéria multirresistente <i>Klebsiella pneumoniae</i> comparando os efeitos entre as dietas Standard, High Fat e Ketogenic.....	57
5.5 O fenótipo de susceptibilidade à infecção não é reproduzido em moscas infectadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> não resistente e alimentadas com dieta Standard, High Fat ou Ketogenic.....	60
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÕES.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	69
9. REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos

Um aumento global no número de infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos ocorreu nos últimos anos, com as infecções causadas por bactérias Gram-negativas muitas vezes mais prevalentes do que infecções Gram-positivas (PATEL *et al.*, 2024). O risco crescente de resistência antimicrobiana entre bactérias Gram-negativas é um problema mundial devido à rápida disseminação de mecanismos de resistência e às limitadas opções de tratamento (MURRAY *et al.*, 2022). Em particular, o desenvolvimento de cepas multirresistentes, que são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, é uma causa de grande preocupação.

Os fatores de risco para o surgimento da resistência antibacteriana são multifacetados (Figura 1). Dentre os principais fatores de risco que contribuem para o surgimento da resistência antibacteriana destacam-se: o uso excessivo e inadequado de antibióticos na medicina humana, tanto na comunidade como em ambientes hospitalares, incluindo prescrição excessiva por médicos de clínica geral e automedicação; a dosagem inadequada e má adesão às diretrizes de tratamento; o uso de antibióticos na produção animal e na agricultura; os fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento da resistência aos antibióticos (PRESTINACI, PEZZOTTI, PANTOSTI; 2015). Esses fatores criam pressão seletiva sobre as bactérias, levando à sobrevivência e proliferação de cepas resistentes. Além disso, pressões seletivas na interface hospedeiro-patógeno selecionam adaptação e/ou evolução microbiana. O sistema imunológico inato utiliza fagócitos e neutrófilos para atingir patógenos microbianos no local das infecções. Essas células podem matar células microbianas, fagocitando-as e/ou liberando moléculas antimicrobianas. Os patógenos provocam respostas fisiológicas e/ou evoluem adaptações ao longo da infecção que lhes permitem contornar esses estresses e sobreviver apesar da presença de moléculas ofensivas do hospedeiro. À medida que a infecção avança, a interface hospedeiro-patógeno torna-se povoada por mutantes que são selecionados para melhor sobrevivência, como mutantes capazes de lidar com espécies reativas de oxigênio do hospedeiro ou

mutantes com maior formação de biofilme para proteger de fagocitose e/ou peptídeos antimicrobianos. (BAISHYA&WAKEMAN, 2019).

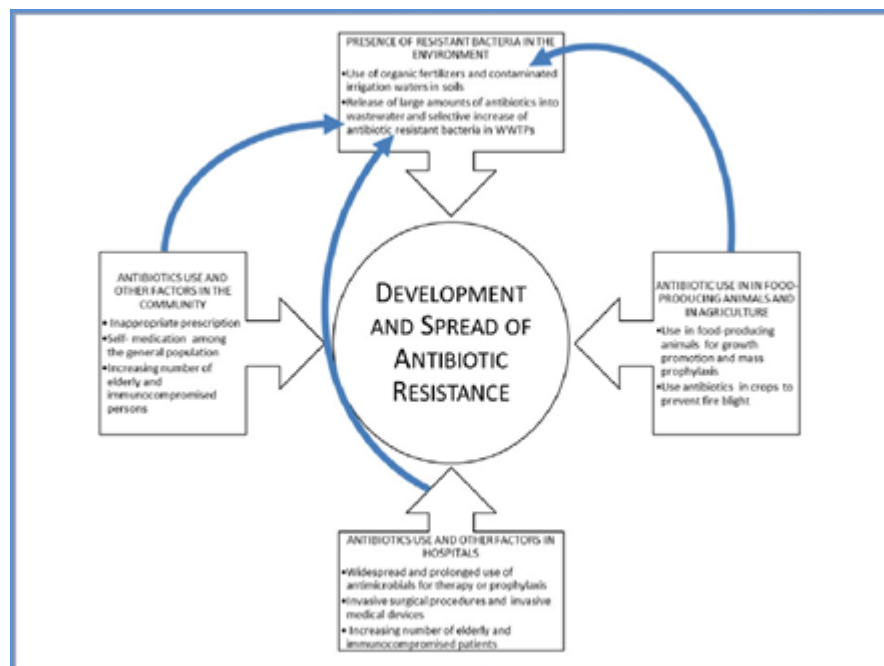


Figura 1: Fatores envolvidos na propagação da resistência aos antibióticos, nos setores: medicina humana na comunidade e no hospital, produção animal e agricultura, e meio ambiente. Esses setores também estão interligados: o uso indevido de antibióticos em seres humanos, animais e agricultura é o principal responsável pela presença de bactérias resistentes no meio ambiente (PRESTINACI, PEZZOTTI & PANTOSTI, 2015).

Em 2019, seis agentes patogênicos foram responsáveis, cada um, por mais de 250.000 mortes associadas à RAM (Figura 2): *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, por ordem de número de mortes. Juntos, esses seis agentes patogênicos foram responsáveis por 929 mil de 1,27 milhões de mortes atribuíveis à RAM e 3,57 milhões de 4,95 milhões de mortes associadas à RAM a nível mundial (MURRAY *et al.*, 2022).

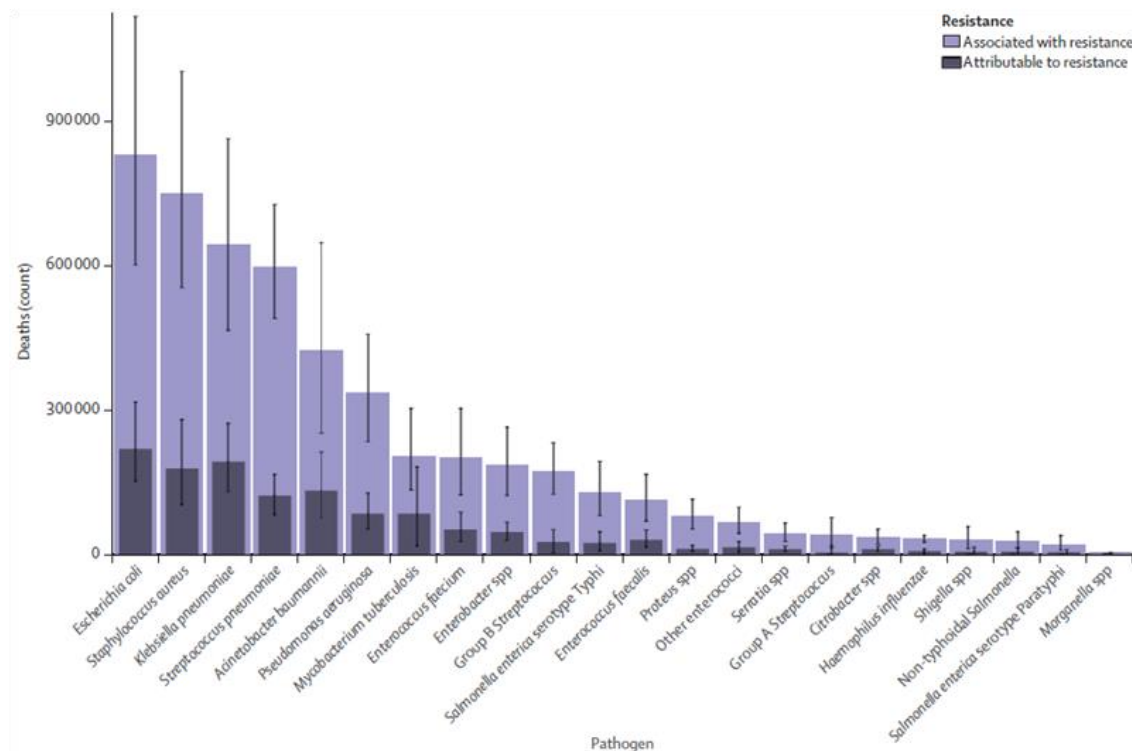


Figura 2: Mortes globais, por patógenos, atribuíveis e associadas à resistência bacteriana aos antimicrobianos, 2019 (MURRAY *et al.*, 2022).

Dentre esses patógenos, a *K. pneumoniae* vem ganhando atenção devido a identificação de cepas hipervirulentas, resistentes e multirresistentes a antimicrobianos, (YAO, QIN, CHEN & SHEN *et al.*, 2018; ZHANG, JIN, OUYANG & WANG *et al.*, 2019). Bactérias do gênero *Klebsiella* são conhecidas como um importante reservatório de genes de resistência a antibióticos e capazes de disseminar tais genes para outras bactérias Gram-negativas.

A bactéria *K. pneumoniae* foi descrita pela primeira vez em 1882 pelo microbiologista alemão Carl Friedlander, isolada do pulmão de pacientes que morreram com pneumonia. Pertencente à família Enterobacteriaceae, é caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, encapsulada, em forma de bastonete, sem motilidade, anaeróbia facultativa e fermentadora de lactose (BENGOECHEA & SA PESSOA, 2019).

A *K. pneumoniae* é ubiqüamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada na água, solo e colonizando a superfície de mucosas na região

nasofaríngea e no trato gastrointestinal. No entanto, é frequentemente associadas a infecções oportunistas em ambientes hospitalares, pois apesar de colonizar principalmente o intestino, em indivíduos imunocomprometidos a *K. pneumoniae* pode se disseminar para diferentes tecidos e causar especialmente pneumonias, infecções do trato urinário e infecções sanguíneas, que podem culminar em sepse (MARTIN & BACHMAN, 2018).

Em unidades de tratamento intensivo (UTI) a *K. pneumoniae* é um importante problema, atingindo principalmente neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos e causando infecções com taxa de mortalidade significativa e em ascendência (LI, LI, HU & HU *et al.*, 2020; XU, SUN & MA, 2017). Sendo assim, podemos considerar a *K. pneumoniae* como um patobionte, uma vez que em circunstâncias normais, vive como um simbiote presente na microbiota intestinal e sendo não prejudicial, no entanto é um potencial patógeno para o hospedeiro quando há um desbalanço na composição da microbiota (HORNEF, 2015).

1.2. A dieta como modulador entre a microbiota intestinal afetando os mecanismos de defesa do hospedeiro

A intervenção nutricional tem sido proposta como uma abordagem terapêutica potencial, visando tanto a microbiota intestinal como o sistema imunológico (CODELLA, LUZI & TERRUZZI *et al.*, 2021). Como a dieta pode ser um fator facilmente maleável, diversos estudos discutem a relevância da imunonutrição, que consiste em modificar a oferta de nutrientes para modular as respostas imunes (GARCIA-MONTERO *et al.*, 2021).

A dieta é descrita como um dos principais fatores que molda a microbiota intestinal e o sistema imunológico, promovendo um efeito rápido na composição da microbiota intestinal, o que implica o crescimento de certos grupos bacterianos em detrimento de outros, bem como alterações no pH intestinal, na permeabilidade intestinal, nos metabólitos bacterianos e, portanto, na inflamação (LEWIS *et al.*, 2015; NISHIDA *et al.*, 2018)

É importante compreender que mais do que a quantidade, a qualidade dos alimentos e dos seus nutrientes é considerada o fator mais determinante em

uma dieta saudável ou não saudável (Figura 3). Dietas ocidentais são ricas em produtos refinados e pobres em micronutrientes, como vitamina A ou D, e fibras, provocando deficiência nas respostas inflamatórias em longo prazo. Em contraste, os benefícios de alguns componentes funcionais encontrados em dietas saudáveis, tal como a dieta mediterrânea, (prebióticos e polifenóis) são importantes na restauração da saúde intestinal em doenças (WAN *et al.*, 2019).

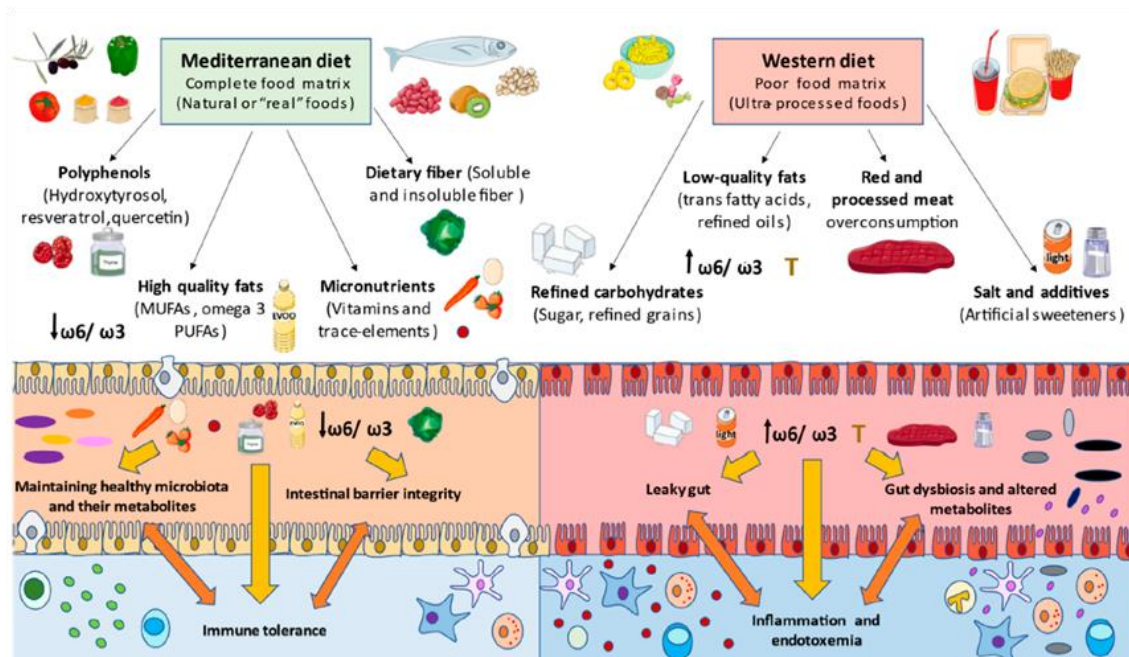


Figura 3: Uma visão geral dos principais componentes nutricionais que modulam a microbiota intestinal e o sistema imunológico. A dieta mediterrânea, rica em alimentos de origem vegetal, apresenta polifenóis, gorduras de alta qualidade (MUFAs e PUFA ricos em ômega 3), micronutrientes, como vitaminas e oligoelementos, e fibras alimentares que determinarão as suas propriedades benéficas na manutenção da eubiose da microbiota intestinal e dos seus produtos metabólicos, juntamente com a integridade da barreira intestinal. Por outro lado, as dietas ocidentais, caracterizada por baixos níveis de fibras alimentares ou micronutrientes, apresentam uma infinidade de componentes nutricionais, incluindo carboidratos refinados (açúcar e grãos refinados), gorduras de baixa qualidade (ácidos graxos trans), sal e aditivos prejudiciais à saúde (principalmente adoçantes). Além disso, elas compreendem uma matriz alimentar pobre que terá efeito prejudicial na barreira intestinal, levando a permeabilidade intestinal, disbiose intestinal e metabólitos alterados, levando ainda a uma inflamação local e à presença de LPS na corrente sanguínea (GARCIA-MONTERO *et al.*, 2021)

A composição da microbiota do hospedeiro tem sido cada vez mais estudada como um contribuinte fundamental para o estado de saúde e doença,

influenciando a defesa contra microrganismos patogênicos e a susceptibilidade a infecções (ZHENG, LIWINSKI & ELINAV, 2020; GALVÃO *et al.*, 2018; MACIA *et al.*, 2015; FAGUNDES *et al.*, 2012; BELKAID & HARRISON, 2017). Manter o delicado equilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro é um processo complexo. A perturbação desse equilíbrio (denominada disbiose) está associada a alterações na microbiota com aumentos notáveis em grupos de bactérias que transportam genes de resistência antimicrobiana (LEONIDAS-CARDOSO *et al.*, 2020; PAMER, 2016). Estressores ambientais, incluindo infecções, têm sido invocados como possíveis gatilhos para a disbiose intestinal.

Dentre os fatores ambientais que modulam a microbiota intestinal, a dieta é um dos mais importantes, modulando as interações hospedeiro-microbiota (ZHENG, LIWINSKI & ELINAV, 2020). Dietas com má composição nutricional, típicas dos países ocidentais, estão associadas à disbiose da microbiota intestinal e a uma maior incidência de infecções por patógenos e doenças inflamatórias (AGUS *et al.*, 2016; MALESZA *et al.*, 2021; OLIVER *et al.*, 2022). As dietas ocidentais são caracterizadas pelo aumento do consumo de alimentos processados e com alta densidade energética, redução do consumo de frutas/vegetais (uma fonte essencial de fibra) e deficiência de vitaminas. A mudança nutricional ocorrida no mundo ocidental nas últimas décadas correlacionou-se com aumentos significativos na prevalência de doenças inflamatórias (MALESZA *et al.*, 2021; OLIVER *et al.*, 2022; THORBURN, MACIA & MACKAY, 2022; CRUZ, RICCI & VIEIRA, 2021; MASLOWSKI *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2017). À medida que esta evidência evoluiu, foi sugerido que o profundo efeito da dieta na microbiota intestinal que leva à disbiose pode ser a causa natural de doenças inflamatórias e infecciosas. Da mesma forma, descobriu-se que uma maior frequência de transferência horizontal de genes é induzida no microbioma de indivíduos de populações industrializadas e urbanas, sugerindo que o estilo de vida do hospedeiro pode impactar o resistoma do microbioma (GROUSSIN *et al.*, 2021). Por outro lado, uma dieta balanceada, especialmente uma dieta rica em fibras, está altamente correlacionada à homeostase do hospedeiro e a uma menor taxa de doenças infecciosas (GALVÃO *et al.*, 2018; MACIA *et al.*, 2015; THORBURN, MACIA & MACKAY, 2014). Além disso, uma dieta balanceada pode selecionar

microrganismos benéficos em detrimento de patógenos e patobiontes, por exemplo, o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp) (OLIVER *et al.*, 2022; CONLON & BIRD, 2014).

A disbiose e o crescimento excessivo favorecem a competição entre bactérias e respostas imunológicas desequilibradas do hospedeiro, criando uma pressão altamente seletiva com altas concentrações de compostos antimicrobianos. Juntas, essas condições provavelmente favorecerão a seleção e disseminação da resistência antimicrobiana. Assim, há uma evidência de que a microbiota desequilibrada (disbiose) promove a susceptibilidade a infecções e que a modulação da microbiota através da dieta pode ajudar a controlar tais infecções (ZHENG, LIWINSKI & ELINAV, 2020; CONLON & BIRD, 2014; BOLTE *et al.*, 2021).

1.3 Drosophila como um modelo animal experimental para decifrar os mecanismos de modulação da microbiota

1.3.1 Aspectos Gerais

Drosophila melanogaster, também conhecida como mosca-da-fruta, é um inseto holometabólico, conseqüentemente, seu ciclo de vida abrange os quatro estágios de desenvolvimento: embrião, larvas (larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios separadas por muda), pupa e adulto (Figura 4), dos quais apenas as larvas e as moscas adultas são alimentadores ativos. É utilizada em laboratórios como modelo experimental há mais de 100 anos, sendo empregada principalmente para a compreensão de mecanismos genéticos, mas também em estudos acerca de processos fisiológicos, celulares e moleculares (JENNINGS, 2011). Com o passar dos anos a *D. melanogaster* se tornou um dos mais importantes modelos experimentais na área biomédica, em função de alguns fatores como, ciclo de vida curto, prole grande, facilidades éticas, manejo simples e de baixo custo (DOUGLAS, 2019; LUDINGTON & JA, 2020).

Nos últimos 25 anos, a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, emergiu como um dos principais modelos para estudar as interações hospedeiro-microrganismo. Graças, em parte, ao alto grau de conservação evolutiva entre as vias de sinalização e sistemas de órgãos de mamíferos e moscas, estudos usando o modelo de *Drosophila* lançaram luz não apenas sobre os mecanismos moleculares básicos de reconhecimento de patógenos e sinalização do fator nuclear- κ B, mas também sobre a natureza das respostas fisiológicas ativadas no hospedeiro pela infecção e como a desregulação dessas respostas contribui para a doença. (BUCHON, SILVERMAN & CHERRY, 2014; LEMAITRE & HOFFMANN, 2007; PADMANABHA & BAKER, 2014)

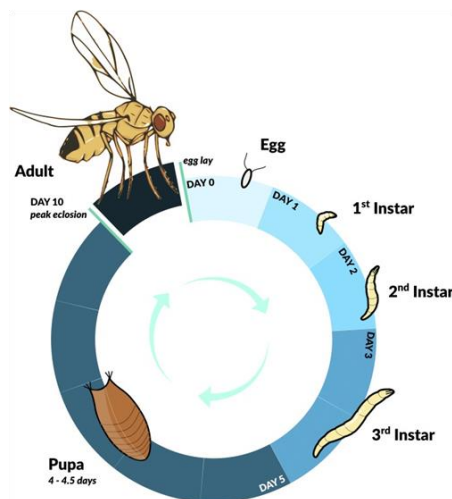


Figura 4: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Inseto holometábolo, com o estágio de embrião, três ínstaras larvais, estágios de pupa e forma adulta. (FLATT, 2019)

1.3.2 Morfologia e anatomia da mosca

Embora a estrutura corporal do inseto seja mais simples que a dos mamíferos, a anatomia da mosca-da-fruta inclui sistemas de órgãos com funções equivalentes às de mamíferos. Por exemplo, como o sistema gastrointestinal dos mamíferos, o trato digestivo da mosca-da-fruta é responsável pela digestão e absorção de nutrientes. O trato gastrointestinal, que atravessa todo o corpo dos animais adultos, é revestido por um epitélio simples de células colunares ou cuboidais chamadas enterócitos, que secretam enzimas digestivas e absorvem nutrientes (Figura 5). Os músculos viscerais

que circundam o tubo epitelial provocam movimento peristáltico. (LEMAITRE & MIGUEL-ALIAGA, 2013)

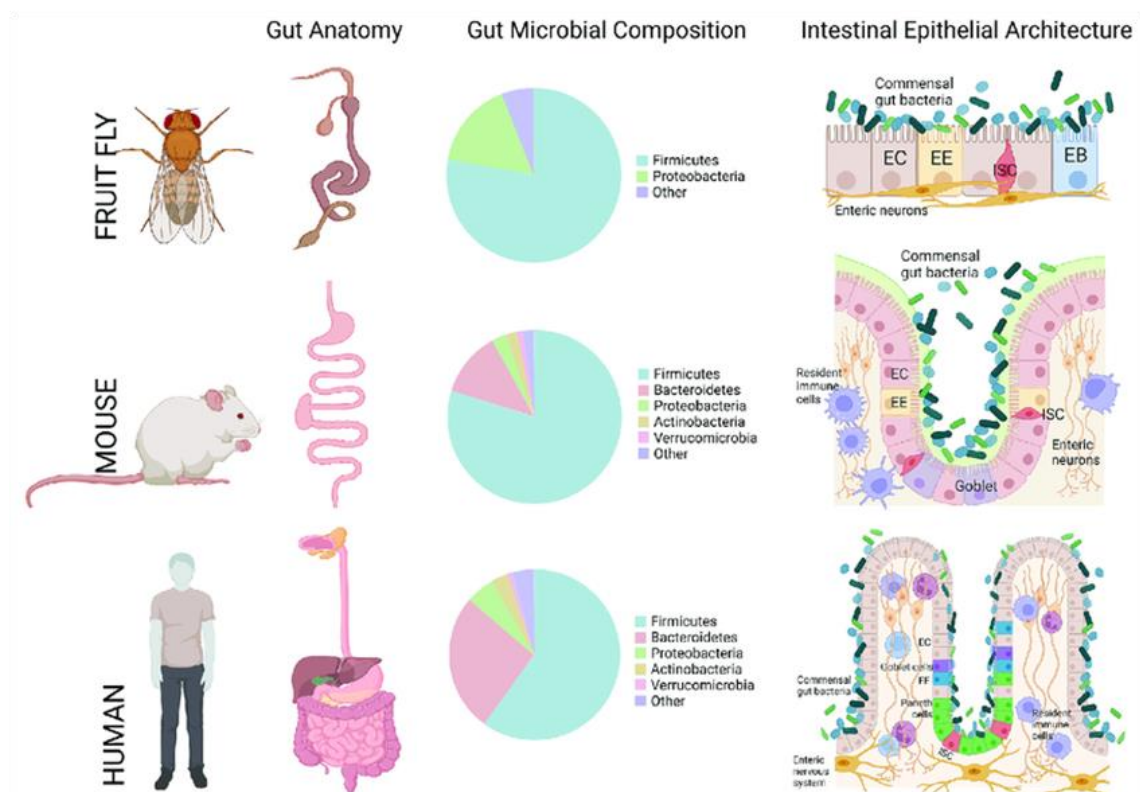


Figura 5: Uma comparação da anatomia macroscópica do trato gastrointestinal, composição da microbiota intestinal e arquitetura epitelial intestinal geral entre *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*. Os intestinos médio e posterior da *Drosophila* são funcionalmente análogos ao intestino delgado e ao cólon humano, respectivamente. O intestino anterior, onde se encontra o divertículo (*Crop*), é funcionalmente análogo ao estômago de humanos. No intestino delgado, para camundongos e humanos, e no intestino médio, para a mosca-da-fruta, todas as três espécies compartilham a população microbiana Firmicutes e Bacteroidetes como os filos residentes dominantes. (MAKDISSI, PARSONS & DI CARA, 2023).

O trato gastrointestinal da *Drosophila* consiste em três partes principais: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior (Figura 6). Como nos mamíferos, as diferentes partes do trato digestivo da *Drosophila* são altamente especializadas em anatomia, organização e função. O intestino anterior começa com a cavidade oral (faringe) seguida pelo esôfago, que está conectado ao papo, um órgão de armazenamento de alimento. O intestino anterior e o intestino médio são separados por um órgão semelhante a uma válvula, a cárdia, cuja porção do intestino anterior é o proventrículo. A cárdia

secreta a matriz peritrófica, uma estrutura semipermeável não celular composta de quitina e glicoproteínas, e envolve o bolo alimentar no intestino médio. Análoga ao papel das secreções mucosas do trato digestivo dos vertebrados, a matriz peritrófica forma uma barreira física que protege o epitélio do intestino médio de *Drosophila* de partículas nocivas e patógenos. Os túbulos de Malpighi, que desempenham um papel análogo ao dos rins nos vertebrados, estão conectados ao intestino no intestino médio-intestino posterior. O intestino posterior funciona na reabsorção de água e íons antes da excreção fecal, semelhante ao intestino grosso dos mamíferos. O intestino posterior termina no ânus, que está localizado no último segmento abdominal. (SHANBHAG & TRIPATHI, 2009; LEMAITRE & MIGUEL-ALIAGA, 2013)

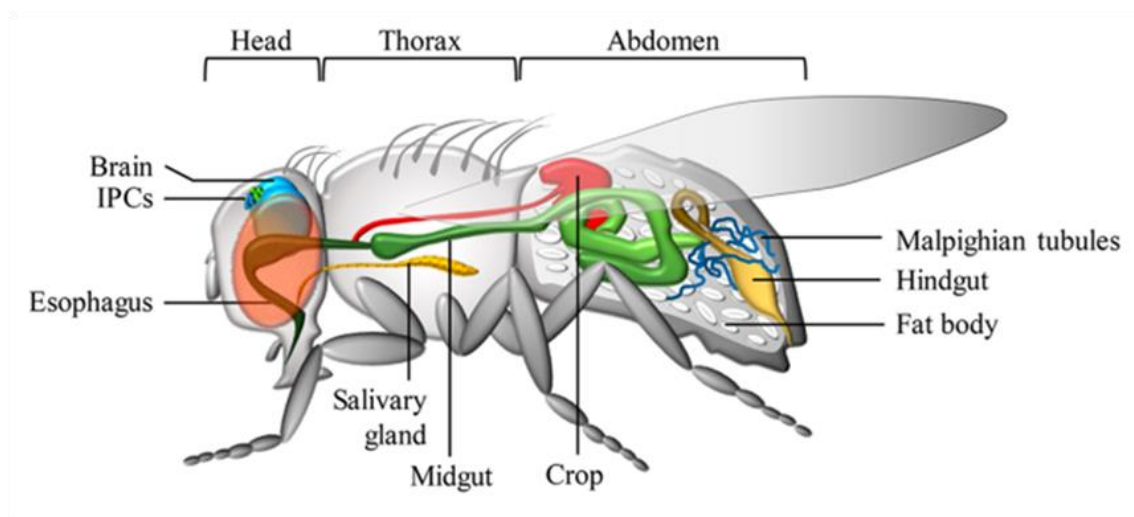


Figura 6: Desenho esquemático da anatomia de *Drosophila melanogaster* com foco no trato digestivo. (STAATS *et al.*, 2018)

1.3.3 Microbiota da mosca

A composição da microbiota intestinal da mosca é diretamente influenciada por fatores genéticos do hospedeiro e por fatores ambientais, como o local em que habita e a dieta que consome, dessa forma, há uma variação na composição do microbioma intestinal entre moscas de diferentes populações, bem como entre moscas capturadas na natureza e mantidas em laboratório (CHAPLINSKA, GERRITSMA, DINI-ANDREOTE, FALCAO SALLES *et al.*, 2016). Em laboratório, a microbiota da *D. melanogaster* possui diversidade média de 1-13 OTU (Unidade Taxonômica Operacional) e as

bactérias mais comumente encontradas fazem parte dos filos Firmicutes e Proteobacteria (Figura 5), mais especificamente os gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*. Além disso, frequentemente o gênero *Gluconobacter* é identificado. A maior parte dos estoques de laboratório apresentam recorrentemente bactérias das espécies *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter pomorum* e *Acetobacter pasteurianus*, embora alguns poucos estudos tenham identificado a presença incomum de bactérias da família Enterobacteriaceae (BRODERICK & LEMAITRE, 2012). A composição da microbiota de moscas capturadas na natureza também é dominada pelos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*, no entanto, possui diversidade média de 35 OTU (PAIS, VALENTE & SPORNIK; 2018). O fato da microbiota de moscas-da-fruta provenientes de estoques de laboratórios ser substancialmente menos diversa, comparado a moscas coletadas no ambiente, se deve em grande parte à composição da dieta. A dieta pobre em nutrientes, a base de farinha de milho, glicose e levedura, é uma fonte escassa de microrganismos por não ser um ambiente ideal para o crescimento de grande parte das bactérias.

A microbiota em *Drosophila* exerce efeitos benéficos no intestino da mosca, incluindo a resposta imunológica, a fisiologia intestinal, a função intestinal e a homeostase intestinal. Devido à presença de apenas um número limitado de bactérias aerotolerantes comensais no intestino, a mosca-da-fruta oferece um modelo de pesquisa ideal para desvendar sistematicamente os efeitos na interação hospedeiro-microbiota. Como a composição da microbiota da mosca-da-fruta é moldada principalmente pela dieta do hospedeiro, o efeito sobre a microbiota de diferentes compostos, nutrientes e/ou medicamentos pode ser facilmente investigado. (BRODERICK & LEMAITRE, 2012)

Além disso, a *D. melanogaster* é também um organismo modelo emergente em estudos sobre o papel ou a função da microbiota, em função da facilidade e o baixo custo para gerar e manter moscas germ-free ou gnotobióticas. O potencial de uso da *D. melanogaster* como modelo experimental em pesquisas sobre o microbioma não se estende apenas às similaridades com mamíferos, sendo importante considerar que este organismo foi um modelo animal fundamental em descobertas de mecanismos biológicos básicos (DOUGLAS, 2018). A combinação de recursos genéticos e

moleculares com estratégias de manipulação da microbiota oferece suporte para explorar os mecanismos da interação microbiota-hospedeiro no contexto de infecções bacterianas, sob a ótica de uma menor complexidade (PAIS *et al.*, 2018).

1.3.4 Estudo de infecção em mosca

Na natureza, a *Drosophila* é naturalmente infectada por vírus, bactérias, fungos e parasitas, e no laboratório, as moscas podem ser infectadas experimentalmente tanto com patógenos de *Drosophila* quanto de humanos, tornando-a um modelo atraente para o estudo de doenças infecciosas (CARPENTER *et al.*, 2007; GALAC & LAZZARO, 2011; PANAYIDOU, IOANNIDOU & APIDIANAKIS, 2014).

A *Drosophila* desempenhou um papel na identificação de fatores de virulência de patógenos humanos oportunistas (KIM *et al.*, 2008). Notavelmente, vários microrganismos empregam mecanismos semelhantes para infectar mamíferos e moscas, e vários fatores de virulência necessários para a invasão e colonização de mamíferos também são eficazes contra as moscas (ALARCO *et al.*, 2004; CHAMILOS *et al.*, 2009; FAUVARQUE, 2014).

Para combater a infecção, a *Drosophila* depende de respostas imunes inatas celulares e humorais. A resposta celular consiste de fagocitose e encapsulamento (GUILLOU *et al.*, 2016; KOCKS *et al.*, 2005). A resposta humoral inclui a cascata da profenoloxidase, que leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e coagulação, e a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) principalmente pelo corpo gorduroso, um órgão funcionalmente análogo ao fígado e tecidos adiposos de mamíferos (BOMAN, NILSSON & RASMUSON, 1972; BUCHON *et al.*, 2014; TAUSZIG *et al.*, 2000). As vias Toll e Imd são as principais cascatas de sinalização responsáveis pela produção de peptídeo antimicrobiano (LEMAITRE & HOFMANN, 2007).

Além disso, a natureza da resposta imune em *Drosophila* pode ser afetada por fatores ambientais, fisiológicos e genéticos; portanto, atenção especial deve ser dada ao controle dessas variáveis experimentais, sempre que possível. Por exemplo, o jejum aumenta a susceptibilidade à infecção tanto

em insetos como em humanos, e alterações nas proporções de componentes dietéticos específicos, tais como carboidratos, proteínas e gordura, têm sido implicadas na formação da resposta imunitária à infecção (COTTER *et al.*, 2010; SCHAIBLE & KAUFMANN, 2007).

Em laboratório, existem dois métodos predominantes para estudar a infecção em *Drosophila*: microinjeção e infecção oral (Figura 7). Ambos os métodos permitem aos pesquisadores estudar as interações patógeno-hospedeiro em toda a escala animal, e também é possível estudar o efeito de patógenos que não infectam *Drosophila melanogaster* na natureza (TROHA&BUCHON, 2019).

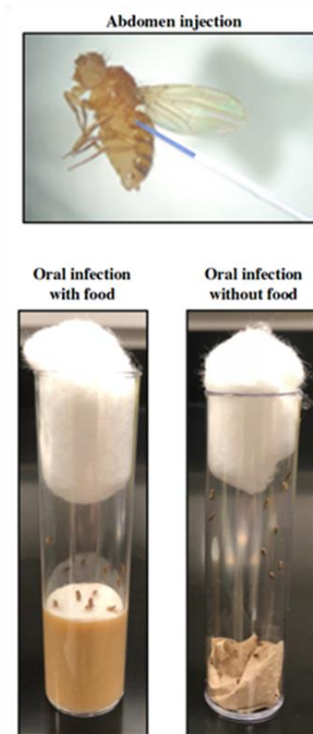


Figura 7: Técnicas de infecção em *Drosophila*. **A.** Mosca injetada no abdômen com volume definido usando um micro injetor. **B.** Dois métodos estão disponíveis para infecção oral. No primeiro, moscas anteriormente em jejum são infectadas por via oral usando um disco de papel de filtro Whatman pré-cortado embebido em uma solução bacteriana. O disco de papel fica sobre a comida em um frasco para moscas. Essa colocação garante que as moscas recebam o inóculo e também os nutrientes, que são absorvidos pelo filtro. O segundo protocolo coloca as moscas em um frasco sem comida, onde se alimentam de um pequeno pedaço de guardanapo Tork embebido em uma solução bacteriana. A disponibilidade de uma fonte de nutrientes além

da solução bacteriana distingue os dois métodos (Figura adaptada de TROHA&BUCHON, 2019).

Até o presente momento, apenas um único estudo realizou a infecção sistêmica em moscas-da-fruta com a *K. pneumoniae* (BENGHEZAL, FAUVARQUE, TOURNEBIZE, FROQUET *et al.*, 2006). No entanto, em trabalho não publicado do nosso grupo de pesquisa foi realizada a padronização de infecções tanto por via sistêmica quanto por via oral na *Drosophila melanogaster* pela *K. pneumoniae*. Resultados preliminares demonstraram que a *K. pneumoniae* foi capaz de infectar sistemicamente a *D. melanogaster* e afetar a sobrevivência de moscas fêmeas convencionais. Já em machos a infecção sistêmica por *K. pneumoniae* induziu efeitos apenas nas moscas germ-free. Esses resultados sugerem que a microbiota participa na resposta do hospedeiro frente à infecção por *K. pneumoniae*

2. JUSTIFICATIVA

Dada a forte evidência de que a microbiota desequilibrada promove a suscetibilidade a infecções e que componentes da dieta podem modular a microbiota do hospedeiro, levantou-se o questionamento sobre quais seriam os efeitos de diferentes composições nutricionais na microbiota do hospedeiro e como isso impactaria no controle da infecção pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria multirresistente a antimicrobianos. A busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos na interação dieta-microbiota-hospedeiro e por estratégia de modulação da microbiota, a fim de restaurar a homeostase e o equilíbrio da composição desta, poderiam ser de grande valia como estratégias terapêuticas alternativas e/ou adjuvantes no tratamento de doenças infecciosas, especialmente para infecções de difícil tratamento, como as causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos. Nesse contexto, esse trabalho visa identificar fatores da dieta que possam interferir no controle da infecção oral induzida por uma bactéria multirresistente a antimicrobianos pelo hospedeiro avaliando o impacto na microbiota, através da análise de cultivo dependente de microrganismos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes dietas na interação microbiota e hospedeiro frente à infecção por bactéria resistente a antimicrobianos utilizando como modelo experimental *Drosophila melanogaster*.

3.2 Objetivos específicos

a. Padronizar dietas com diferentes composições que mimetizam tanto dietas ocidentais, caracterizadas pelo alto teor de gorduras e açúcares simples, e baixo teor de fibras; quanto dieta mediterrânea, qualificada pelo alto teor de fibras e polissacarídeos, no modelo de *Drosophila melanogaster*.

b. Avaliar se os diferentes tipos de dietas (standard diet, high fiber diet, high sucrose diet, high fat diet, ketogenic diet) afetam a sobrevivência da *Drosophila melanogaster*, comparando macho e fêmea.

c. Avaliar a composição da microbiota intestinal e da carcaça nos animais dos grupos dos diferentes tipos de dietas (standard diet, high fiber diet, high sucrose diet, high fat diet, ketogenic diet).

d. Avaliar o impacto das diferentes dietas na resposta da *D. melanogaster* frente a infecção causada pela bactéria resistente a antimicrobianos *Klebsiella pneumoniae*, avaliando: sobrevivência e alterações da composição da microbiota intestinal

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estoque e manutenção da *Drosophila melanogaster*

Neste trabalho, foi utilizada a mosca da espécie *Drosophila melanogaster*, linhagem selvagem Canton-S, gentilmente cedida pelo professor Dr. João Trindade Marques, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Em nosso laboratório, as moscas foram mantidas em estufa, sob condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), em tubos contendo meio semi sólido à base de farinha de milho, sacarose e levedura, denominada dieta padrão.

4.2 Padronização das dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic em laboratório

Em laboratório, a dieta típica da *Drosophila melanogaster* é composta de ágar, fermento, uma fonte de açúcar e fubá. No entanto, na realidade, as composições dietéticas variam muito entre laboratórios, tornando difícil definir claramente a composição de uma dieta “padrão” para moscas. Existem dietas “padrão” comumente usadas, como a dieta Bloomington Standard (Figura 8), que se originaram nos primeiros centros de pesquisa de *D. melanogaster*. Embora muitos grupos de laboratórios baseiam suas dietas nessas receitas, a maioria dos grupos mantém as moscas com dietas exclusivas de seu laboratório.



Figura 8: Dieta padrão de *Drosophila* - formulação de Bloomington. (Disponível em: <https://www.scientificlabs.ie/product/drosophila-food/FLY1034>. Acesso em: 26 jan. 2024).

A dieta padronizada pelo Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), da Universidade de Indiana é composta pelos seguintes ingredientes e suas respectivas proporções: água (100 mL); farinha de soja (1 g); farinha de milho (7,3 g); xarope de milho (7,6 mL); ágar (0,6 g); extrato de levedura (1,73 g) e ácido propiônico (0,5 mL). Para a realização deste trabalho, a dieta padrão, denominada aqui de Standard Diet (ST), foi adaptada da dieta elaborada pelo BDSC, bem como de outra dieta descrita na literatura (VAN DAM *et al.* 2020). Portanto, após as modificações necessárias para viabilizar a preparação da Standard Diet utilizada neste trabalho, o conteúdo final da dieta ficou definido nos seguintes ingredientes e proporções: água (100 mL); farinha de milho (5 g); açúcar (7,3 g); ágar (1,6 g); extrato de levedura (2,33 g) e Metil P-hidroxibenzoato (0,6 mL). Na composição de macronutrientes da dieta prevalece o carboidrato, com 94,34%, sendo este proveniente, em sua maior parte, do açúcar. Proteínas e gorduras representam, respectivamente, 4,63% e 1,03% (Tabela 1).

Para padronizar a dieta rica em fibra a ser administrada para a *D. melanogaster*, a pectina da maçã (Synth), uma fibra solúvel, foi adicionada a Standard Diet das moscas, em uma concentração de 3% m/v. Em trabalho não publicado do nosso grupo de pesquisa, foi observado um aumento significativo nos níveis de acetato entre as moscas administradas com a dieta contendo 3% de pectina, comparado ao grupo de moscas controle que se alimentaram de uma dieta padrão. Em oposição, a dieta contendo 0,3% de pectina não levou a alteração significativa nos níveis de acetato (Figura 9).

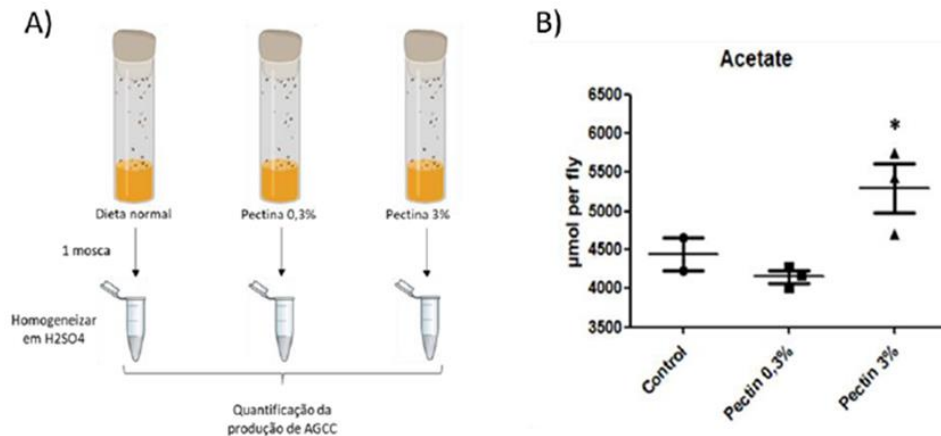


Figura 9: Delineamento do experimento de padronização da dieta rica em fibra para a *D. melanogaster* e dosagem do Acetato, um AGCC. A. As moscas-da-fruta adultas (1-6 dias de idade) inicialmente foram mantidas por 7 dias em três tipos de dietas diferentes, sem pectina (dieta normal), com 0,3% de pectina e com 3% de pectina. Os testes foram realizados em triplicatas experimentais e cada tubo continha 10 moscas. As moscas foram processadas inteiras e separadamente com o auxílio de um pistilo em H_2SO_4 , centrifugados e em seguida o macerado foi filtrado em um filtro de celulose 0,22 μm . B. O filtrado obtido foi utilizado para a dosagem de acetato, através da quantificação por HPLC-UV, um ácido graxo de cadeia curta, que controla o metabolismo e o sistema imune do hospedeiro (KAMAREDDINE, ROBINS, BERKEY, MEKALANOS *et al.*, 2018; KUMAR; RANI; DATT, 2020). Concentração em μM de acetato detectado por mosca. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). * $p = 0,0332$. (Dissertação Viviani Mendes, 2020).

A High Fiber Diet (HF), portanto, ficou constituída como a Standard Diet com acréscimo de pectina da maçã, contendo as seguintes proporções: água (100 mL); farinha de milho (5 g); açúcar (7,3 g); ágar (1,6 g); extrato de levedura (2,33 g); pectina (3 g) e Metil P-hidroxibenzoato (0,6 mL). Na composição de macronutrientes da dieta prevalece o carboidrato, com 93,84%, sendo este proveniente, em sua maior parte, do açúcar, seguido da pectina. Proteínas e gorduras representam, respectivamente, 3,72% e 2,43% (Tabela 2).

A padronização da High Sucrose Diet (HS) seguiu o proposto por van Dam, ESTHER *et al.* (2020), a qual padronizou uma dieta rica em açúcar na concentração de 20% m/v. A High Sucrose Diet (HS), portanto, ficou constituída como a Standard Diet com acréscimo de mais açúcar, possuindo as seguintes proporções: água (100 mL); farinha de milho (5 g); açúcar (20 g);

ágar (1,6 g); extrato de levedura (2,33 g) e Metil P-hidroxibenzoato (0,6 mL). Na composição de macronutrientes da dieta predomina o carboidrato, com 97,7%, sendo este proveniente, em sua maior parte, do açúcar. Proteínas e gorduras representam, respectivamente, 1,9% e 0,4% (Tabela 3).

A High Fat Diet (FAT) utilizada neste trabalho foi uma adaptação de Cormier, ROBERT *et al.* (2018), portanto ficou constituída como a Standard Diet com acréscimo de óleo de coco, possuindo as seguintes proporções: água (100 mL); farinha de milho (5 g); açúcar (7,3 g); ágar (1,6 g); extrato de levedura (2,33 g) e Metil P-hidroxibenzoato (0,6 mL). Na composição de macronutrientes da dieta, diferentemente da Standard Diet, da High Fiber Diet e da High Sucrose Diet, prevalece a gordura, com 60,98%, sendo esta proveniente, em sua totalidade, do óleo de coco. Carboidratos e proteínas representam, respectivamente, 37,19% e 01,83% (Tabela 4).

A utilização dessa dieta em laboratório exigiu que se fizessem adaptações importantes a fim de garantir que a consistência da dieta se mantivesse sólida e não comprometesse a sobrevivência das moscas. Foi observado que, se essa dieta fosse mantida à temperatura acima de 25°C, a consistência da comida ficaria alterada em decorrência da presença de óleo de coco em sua composição que, a essa temperatura, torna-se líquido, formando uma película na superfície da comida. A *Drosophila*, ao entrar em contato com o óleo de coco líquido, fica com suas patas e asas impregnadas de óleo, o que faz com que elas morram aderidas à superfície da comida ou à superfície do frasco (Figura 10). Portanto, para resolver esse problema, testou-se manter a dieta a uma temperatura de 24° C, e observou-se que a consistência da comida não foi alterada e, conseqüentemente, não impactou a taxa de sobrevivência das moscas alimentadas por essa dieta.



Figura 10: *Drosophila melanogaster* submetida à High Fat Diet, a uma temperatura acima de 25°C. Acima de 25°C, o óleo de coco se liquefaz, sendo observada a formação de uma película de óleo na superfície da comida, comprometendo a consistência ideal da dieta para o consumo das moscas. Como consequência, foi registrada grande taxa de mortalidade de *Drosophilas* aderidas à superfície do frasco.

A Ketogenic Diet (KETO) utilizada neste trabalho foi adaptada de KAYODE *et al.* (2021) e, diferentemente das dietas anteriores, não tem como base a farinha de milho, mas sim a farinha de coco. Além disso, não possui açúcar adicionado em sua composição, visto que dietas com perfil cetogênico clássico são caracterizadas pela baixa concentração de carboidrato em sua composição de macronutrientes (SHARMA *et al.*, 2022)

Diante disso, após as modificações necessárias para viabilizar a preparação da Ketogenic Diet utilizada neste trabalho, o conteúdo final da dieta ficou definido nos seguintes ingredientes e proporções: água (100 mL); farinha de coco (12 g); farinha de peixe (0,8 g); extrato de levedura (2,33 g); óleo de coco (0,2 mL); ágar (1,6 g) e Metil p-Hidroxibenzoato (0,6 mL). Na composição de macronutrientes da dieta prevalece a gordura, com 79,79%, sendo esta proveniente, em sua maioria, da farinha de coco, seguido do óleo de coco. Proteínas e carboidratos representam, respectivamente, 13,79% e 06,42% (Tabela 5)..

Assim como na High Fat Diet, a utilização dessa dieta em laboratório exigiu que se fizessem adaptações na temperatura a fim de garantir que a consistência da dieta se mantivesse sólida e não comprometesse a sobrevivência das moscas (Figura 11).



Figura 11: *Drosophila melanogaster* submetida à Ketogenic Diet, a uma temperatura de 25°C. Acima de 25°C, o óleo de coco se liquefaz, sendo observada a formação de uma película de óleo na superfície da comida, comprometendo a consistência ideal da dieta para o consumo das moscas. Como consequência, é registrada uma grande taxa de mortalidade de *Drosophilas* aderidas à superfície do frasco.

4.2.1. Comparação do conteúdo nutricional das dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic.

Os cálculos das informações nutricionais foram baseados nas informações fornecidas pelos fabricantes nos rótulos dos produtos.

Tabela 1: Informação nutricional da dieta Standard.

		Carbs (g)	Protein (g)	Fat (g)	Total Kcal
Standard Diet					
Água destilada	100 mL				
Farinha de milho	5 g	0,41 g	0,037 g	0,01 g	
Açúcar	7,3 g	7,3 g	0 g	0 g	
Ágar	1,6 g	0,4 g	0,05 g	0 g	
Extrato de levedura	2,33 g	0,18 g	0,32 g	0,03 g	
Metil P-hidroxibenzoato [10% p/v]	0,6 mL				
% carbs		94,34%			
% protein		4,63%			
% fat		1,03%			
Total grams		8,29 g	0,407 g	0,04 g	
Total Kcal		33,16	1,628	0,36	35,148

Tabela 2: Informação nutricional da dieta High Fiber.

		Carbs (g)	Protein (g)	Fat (g)	Total Kcal
High Fiber Diet					
Água destilada	100 mL				
Farinha de milho	5 g	0,41 g	0,037 g	0,01 g	
Açúcar	7,3 g	7,3 g	0 g	0 g	
Ágar	1,6 g	0,67 g	0,08 g	0 g	
Extrato de levedura	2,33 g	0,18 g	0,32 g	0,03 g	
Pectina	3 g	2,7 g	0,009 g	0,09 g	
Metil P-hidroxibenzoato [10% p/v]	0,6 mL				
% carbs		93,85%			
% protein		3,72%			
% fat		2,43%			
Total grams		11,26 g	0,446 g	0,13 g	
Total Kcal		45,04	1,78	1,17	46,794

Tabela 3: Informação nutricional da dieta High Sucrose.

		Carbs (g)	Protein (g)	Fat (g)	Total Kcal
High Sucrose Diet					
Água destilada	100 mL				
Farinha de milho	5 g	0,41 g	0,037 g	0,01 g	
Açúcar	20 g	20 g	0 g	0 g	
Ágar	1,6 g	0,4 g	0,05 g	0 g	
Extrato de levedura	2,33 g	0,18 g	0,32 g	0,03 g	
Metil P-hidroxibenzoato [10% p/v]	0,6 mL				
% carbs		97,7%			
% protein		1,9%			
% fat		0,4%			
Total grams		20,99 g	0,407 g	0,04 g	
Total Kcal		83,96	1,628	0,36	85,94

Tabela 4: Informação nutricional da dieta High Fat.

		Carbs (g)	Protein (g)	Fat (g)	Total Kcal
High Fat Diet					
Água destilada	100 mL				
Farinha de milho	5 g	0,41 g	0,037 g	0,01 g	
Açúcar	7,3 g	7,3 g	0 g	0 g	
Ágar	1,6 g	0,4 g	0,05 g	0 g	
Extrato de levedura	2,33 g	0,18 g	0,32 g	0,03 g	
Óleo de coco (20% v/v)	6 mL	0 g	0 g	6 g	
Metil P-hidroxibenzoato [10% p/v]	0,6 mL				
% carbs		37,19%			
% protein		1,83%			
% fat		60,98%			
Total grams		8,29 g	0,407 g	5,04	
Total Kcal		33,16	1,628	54,36	89,14

Tabela 5: Informação nutricional da dieta Ketogenic.

		Carbs (g)	Protein (g)	Fat (g)	Total Kcal
Ketogenic Diet					
Água destilada	100 mL				
Farinha de coco	12 g	0,6 g	1,6 g	6,2 g	
Farinha de peixe	0,8 g	0 g	0,56 g	0,081 g	
Fermento seco	2,33 g	0,18 g	0,32 g	0,03 g	
Ágar	1,6 g	0,4 g	0,05 g	0 g	
Óleo de coco	0,2 mL	0 g	0 g	0,2 g	
Metil P-hidroxibenzoato [10% p/v]	0,6 mL				
% carbs		6,42%			
% protein		13,79%			
% fat		79,79%			
Total grams		1,18 g	2,53 g	6,511 g	
Total Kcal		4,72	10,12	58,59	73,43

Em seguida à padronização das dietas, fomos avaliar se essas modificações dietéticas impactam na sobrevivência das moscas comparando as dietas em machos e em fêmeas (Figura 16).

4.3 Ensaio de consumo alimentar

O ensaio de consumo alimentar foi adaptado de CHAKRABORTY *et al.* (2021). As moscas Canton S (15 fêmeas e 15 machos, de 0 a 10 dias de idade) foram colocados em jejum por 2 horas e transferidas para um frasco de alimentação contendo 1,5% de ágar misturado com 0,4% de corante alimentício azul e as respectivas dietas em análise neste trabalho. Após permitir a alimentação por 10 minutos, as 15 moscas de cada frasco foram coletadas em frascos vazios e congeladas a -20 °C. Em tubo Eppendorf de 1,5 mL, as respectivas moscas congeladas foram coletadas e homogeneizadas em 1 mL de PBS 1X usando um homogeneizador portátil. Os tubos foram então

centrifugados a 13000 G por 30 minutos. A densidade óptica (DO) dos sobrenadantes foi medida a 595 nm, utilizando um espectrofotômetro (BioTek 800 TS Absorbance Reader). A DO/mosca foi comparada entre as diferentes condições usando o teste one-way ANOVA.

4.4 Bactérias e condições de cultivo

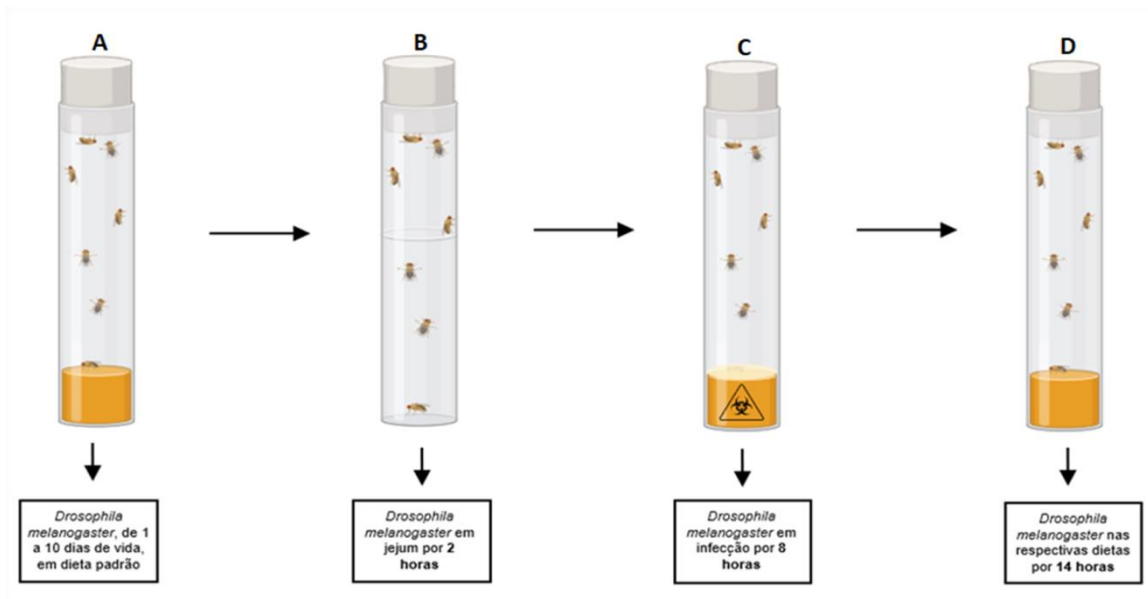
Foram utilizadas bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* ATCCe a bactérias multirresistente *Klebsiella pneumoniae* B31, sendo essa última um isolado bacteriano obtido do lavado broncoalveolar de uma paciente internada em unidade de terapia intensiva no Nordeste do Brasil (PROFETA *et al.*, 2018). Para o estoque, as bactérias foram mantidas em caldo BHI : glicerol 80% estéril, na proporção de 1 : 1 a - 80 °C.

Para preparo do inóculo, 100 µL do estoque das bactérias foram cultivados por 24 horas em 9 mL de meio BHI a 37° C. Em seguida, 100 µL da cultura foi repicado em 9 mL de um novo meio BHI e cultivadas por mais 24 horas a 37° C. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada por 15 minutos, a 1500 RPM, para obtenção do pellet de bactérias e o sobrenadante foi dispensado.

Para a infecção oral, o sedimento bacteriano foi ressuscitado em salina estéril. A suspensão bacteriana continha uma concentração média de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, a qual foi conferida através do plaqueamento e contagem das colônias a cada experimento.

4.5 Infecção oral

Para a infecção oral foram utilizadas moscas convencionais adultas de 1-10 dias de idade. Primeiramente, as moscas foram deixadas em jejum durante 2 horas. Em seguida foram colocadas 15 moscas, por um período de 8 horas, em um tubo contendo papel filtro embebido com 150 µL do inóculo bacteriano ou da solução de salina estéril 0,9%. Finalmente, as moscas foram transferidas para as respectivas dietas, nas quais ficaram durante 14 horas (Figura 12).



⚠ Infecção oral com *Klebsiella pneumoniae* B31

Figura 12: Desenho esquemático da infecção oral em *Drosophila*. **A.** *Drosophilas* de 1 a 10 dias de vida estão submetidas à dieta padrão de laboratório. **B.** As moscas são colocadas em jejum por 2 horas. **C.** *Drosophilas* são colocadas em infecção por 8 horas, em frasco contendo disco de papel filtro embebido pelo inóculo bacteriano. **D.** As moscas são transferidas para frascos contendo as diferentes dietas por 14 horas.

4.6 Análise de sobrevivência (lifespan)

No ensaio de sobrevivência, foram utilizadas 15 moscas por tubo, visando padronizar o número de moscas no interior do recipiente e assegurar que a densidade populacional do frasco fosse adequada para não causar estresse às moscas. Além disso, apenas moscas “de aparência saudável” (sem pernas faltantes e sem asas cortadas) foram incluídas no experimento. Quaisquer indivíduos que morressem nas primeiras 24 horas após o início do experimento seriam excluídos de análises posteriores, uma vez que estas moscas poderiam ter morrido em decorrência da manipulação de um frasco para o outro e não por consequência da dieta ou da infecção. Nesse ensaio, foram realizadas três réplicas biológicas, e o número de moscas mortas em cada recipiente foi registrado diariamente.

4.7 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (CFU)

4.7.1 Técnica de microbiota cultivada

As moscas foram primeiramente resfriadas a -20°C por 10 minutos e cada mosca separadamente foi mergulhada em salina estéril a fim de remover possíveis microrganismos presentes em sua superfície. Em seguida, os animais foram dissecados, com auxílio de um estereomicroscópio (Carl Zeiss AG, Alemanha) e micro pinças (Oduos Instrumentos, Brasil), e o intestino e a carcaça foram separados e mantidos em 300 μL de solução salina. Posteriormente, estes tecidos foram macerados com auxílio de um pistilo em solução salina. Cada amostra continha dois intestinos ou carcaças, formando um *pool*. As diluições foram plaqueadas nos meios de cultura ágar manitol, extrato de levedura e peptona (MYP), ágar manitol, rogosa e sharpe (MRS), ágar MacConkey, e ágar sabouraud com cloranfenicol e incubadas a 37°C . A contagem da CFU foi realizada 24 horas após o plaqueamento. Para a contagem foi selecionada a diluição com 10 a 70 colônias, uma vez que foi realizado o plaqueamento em microgota. O valor obtido foi dividido pelo fator de diluição (grau de diluição x volume plaqueado). Os resultados foram expressos como média de CFU por *pool* de intestinos/carcaças.

4.7.2 Meios de cultura bacteriológica

Para avaliar a carga microbiana total do intestino e da carcaça da mosca, foram utilizados 5 meios de cultura bacteriológico, tanto meio seletivo, quanto meio não-seletivo, visando cultivar o maior número possível de bactérias presentes na *Drosophila melanogaster*.

a. Ágar manitol, extrato de levedura e peptona (MYP)

Indicação: é utilizado para o isolamento de bactérias do ácido acético.

Tabela 6: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.

Água destilada	1000 mL
Placas (25 mL cada)	40 placas
Manitol	25g

Extrato de levedura	5g
Peptona	3g
Ágar	20g

b. Ágar manitol, rogosa e sharpe (MRS)

Indicação: é recomendado para cultivo, enriquecimento e isolamento de *Lactobacillus* spp.

Tabela 7: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.

Água destilada	1000 mL
Placas (25 mL cada)	40 placas
MRS	68,2g

c. Ágar MacCONKEY:

Indicação: isolamento, cultura e identificação de enterobactérias e microrganismos não fermentadores.

Tabela 8: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.

Água destilada	1000 mL
Placas (25 mL cada)	40 placas
MacCONKEY	50g

d. Ágar sabouraud com cloranfenicol:

Indicação: O ágar dextrose Sabouraud com cloranfenicol é usado para o isolamento seletivo de fungos.

Tabela 9: Constituição do meio de cultura ágar dextrose-sorbitol-manitol com as respectivas proporções de cada reagente que compõe o meio.

Água destilada	1000 mL
Placas (25 mL cada)	40 placas
Sabouraud	65g
Cloranfenicol (0,02% m/v)	0,2g

Tabela 10: Comparação da atmosfera, tempo de incubação e microorganismos alvo dos meios de cultura utilizados para avaliar carcaça e intestino das moscas.

Meio de Cultura	Atmosfera	Tempo de incubação	Microorganismo alvo
MRS	Aerobiose e Anaerobiose	1 dia	Lactobacillaceae
MYP	Aerobiose	1 dia	Acetobacteraceae
Ágar MacConkey	Aerobiose	1 dia	Enterobacteriaceae
Ágar Sabouraud	Aerobiose	7 dias	Leveduras

4.8. Estratégia experimental I (Lifespan)

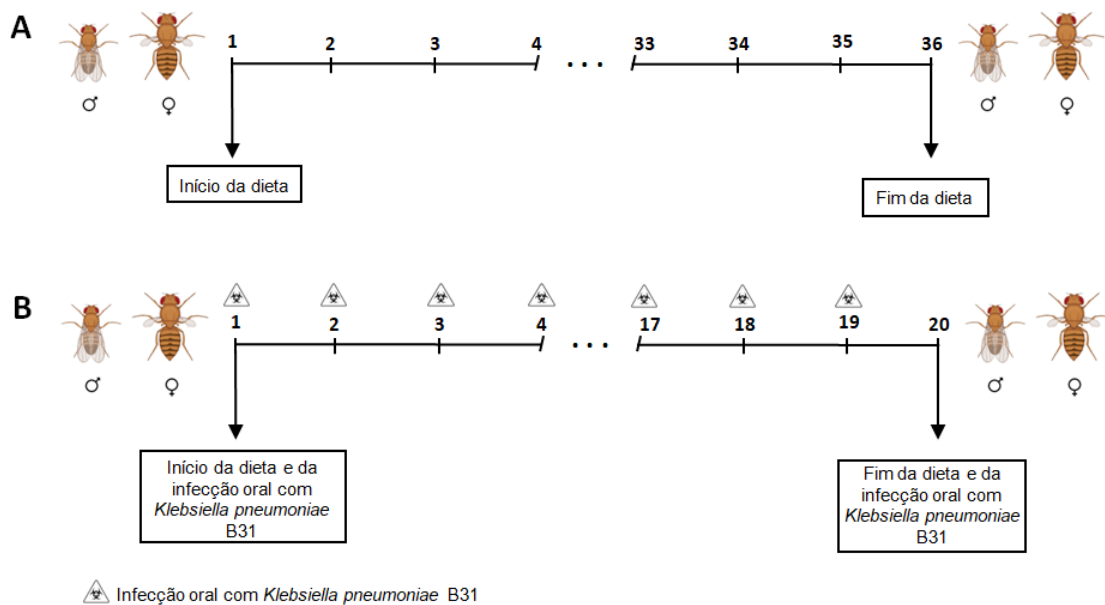


Figura 13: A. Delineamento experimental para avaliação da sobrevivência das moscas após introdução das diferentes dietas. A. As moscas vivas foram contabilizadas por 36 dias consecutivos. As moscas que morreram nas primeiras 24 horas após a introdução das dietas não foram contabilizadas, a fim de evitar falsos positivos, uma vez que a morte poderia ser devido à manipulação do animal e não por causa da dieta em si. **B. Delineamento experimental para avaliação da sobrevivência das moscas após introdução das diferentes dietas e infecção oral com *Klebsiella pneumoniae* B31.** As moscas foram infectadas por via oral por 7 dias consecutivos, sendo que a cada 24 horas as moscas eram repassadas para um novo tubo contendo salina ou um novo inóculo bacteriano. As moscas vivas foram contabilizadas por 20 dias consecutivos ao longo de todo o experimento. As moscas que morreram nas primeiras 24 horas após a introdução das dietas e da infecção oral não foram contabilizadas, a fim de evitar falsos positivos, uma vez que a morte poderia ser devido à manipulação do animal e não por causa da dieta e/ou do patógeno em si.

4.9 Estratégia experimental II (Microbiota cultivada do intestino e da carcaça)

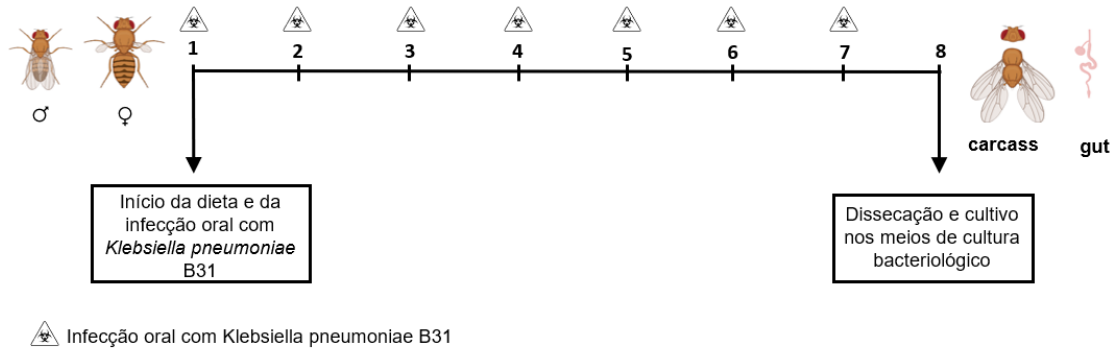


Figura 14: Delineamento experimental para avaliação da microbiota do intestino e da carcaça da *Drosophila melanogaster* após infecção oral com *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. As moscas foram infectadas por via oral por 7 dias consecutivos, sendo que a cada 24 horas as moscas eram repassadas para um novo tubo contendo salina e um novo inóculo bacteriano. No oitavo dia, as moscas foram dissecadas e cultivadas em meios de cultura bacteriológico para análise da carga bacteriana.

4.10 Estratégia experimental III (Cinética da infecção)

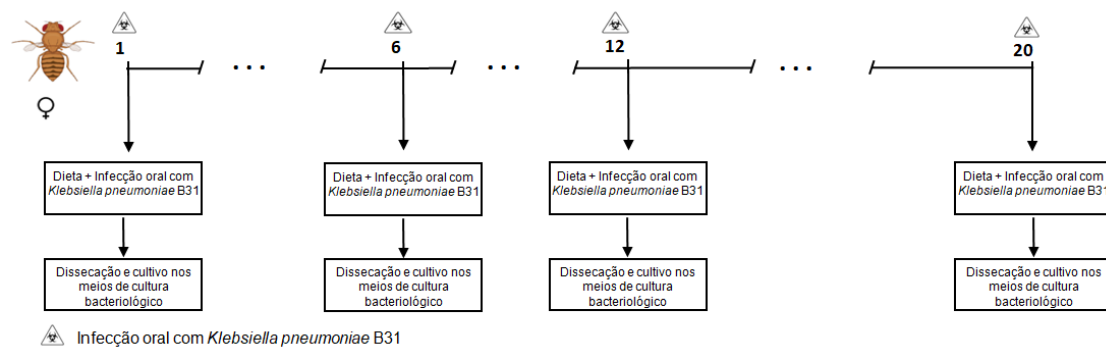


Figura 15: Delineamento experimental para avaliação do efeito do tempo de infecção oral na microbiota do intestino e da carcaça da *Drosophila melanogaster* após infecção com *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. Moscas fêmeas foram infectadas por via oral por 20 dias consecutivos, sendo que a cada 24 horas elas eram repassadas para um novo tubo contendo salina ou um novo inóculo bacteriano. Nos dias 1, 6, 12 e 20 de infecção oral, as moscas foram dissecadas e cultivadas em meios de cultura bacteriológico para análise da carga bacteriana.

4.11 Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para as comparações do efeito da dieta na carga bacteriana e comparações entre o crescimento bacteriano nos grupos não infectados e infectados foi utilizada análise de variância one-way ANOVA. As curvas de sobrevivência foram plotadas utilizando a estimativa de sobrevivência de Kaplan-Meier e as diferenças entre até duas curvas de sobrevivência foram avaliadas pelo método log-rank (Mantel – Cox).

O nível de significância adotado foi de $\alpha \leq 0,05$. Todos os dados foram analisados e plotados utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 As diferentes composições dietéticas impactam na sobrevivência (lifespan) das moscas.

O primeiro passo foi avaliar se as dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic impactam no percentual de sobrevivência de moscas machos e fêmeas. Nesse experimento, triplicatas de 15 machos e 15 fêmeas foram colocadas, separadamente, em frascos contendo as respectivas dietas avaliadas neste trabalho. As moscas vivas e mortas foram contabilizadas por 36 dias consecutivos. As *Drosophilas* que morreram nas primeiras 24 horas após a introdução das dietas não foram contabilizadas, a fim de evitar falsos positivos, uma vez que a morte poderia ser devido à manipulação do animal e não em decorrência da dieta em si. Os frascos de comida eram trocados a cada dois dias para evitar contaminação e, conseqüentemente, uma possível interferência na taxa de sobrevivência dos animais. O registro de morte foi realizado diariamente, no mesmo horário, até que se completassem 36 dias de registro.

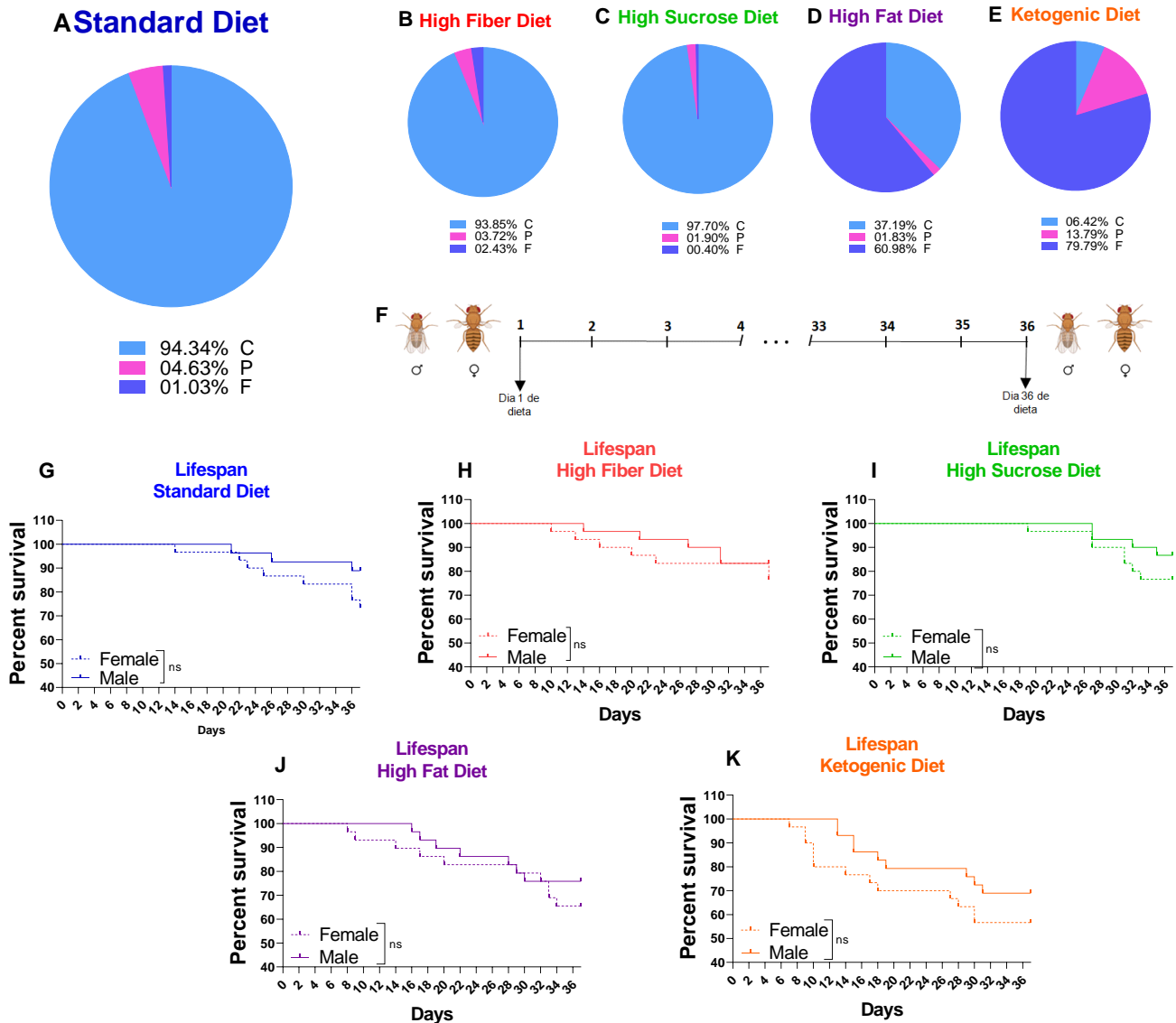


Figura 16: Caracterização e avaliação do impacto das dietas no percentual de sobrevivência de moscas machos e fêmeas. A - E Distribuição dos macronutrientes das dietas. **F-** Desenho experimental do ensaio de sobrevivência das moscas submetidas às dietas (C. Carbohydrate, P. Protein, F. Fat). **G - K** Comparação do percentual de sobrevivência (lifespan) de machos e fêmeas submetidos às diferentes dietas. 15 machos e 15 fêmeas foram colocados, separadamente, em frascos contendo as respectivas dietas avaliadas neste trabalho. Os frascos de comida eram trocados a cada dois dias a fim de evitar contaminação e uma possível interferência na taxa de sobrevivência dos animais. O registro de morte foi realizado diariamente, no mesmo horário, até que se completassem 36 dias de registro. Não foi observada diferença significativa da taxa de sobrevivência entre machos e fêmeas submetidos à mesma fonte de alimento em nenhuma das dietas em estudo.

Nós observamos que com a dieta Standard, durante 36 dias de observação, as moscas machos começaram a morrer a partir do décimo quarto dia, enquanto que as fêmeas, no vigésimo primeiro dia. Nessa dieta, a porcentagem de sobrevivência dos machos, ao final dos 36 dias de observação, foi de 88,88% , e das fêmeas, foi de 73,33% . Quando analisamos o percentual de sobrevivência das moscas na dieta High Fiber, observamos que as moscas machos começaram a morrer no décimo quarto dia, enquanto que as fêmeas, no décimo dia. Ao final do experimento, machos apresentaram um percentual de sobrevivência de 83,33% , e fêmeas, de 76,66% .

A análise da dieta High Sucrose mostrou que as moscas machos começaram a morrer a partir do décimo nono dia, e as fêmeas, a partir do vigésimo sétimo dia. Ao final dos 36 dias de observação, os machos apresentavam uma taxa de sobrevivência de 86,6%, enquanto as fêmeas, uma taxa de 76,6%. Na dieta High Fat, machos começaram a morrer no oitavo dia, e as fêmeas, no décimo sexto dia. Ao final do experimento, os machos apresentavam uma taxa de sobrevivência de 75,86% , e as fêmeas, uma taxa de 65,5%. Finalmente, a análise do grupo Ketogenic mostrou que *Drosophila* machos começaram a morrer no sétimo dia de dieta, enquanto que as fêmeas, no décimo terceiro dia. Ao trigésimo sexto dia de observação, machos apresentavam um percentual de sobrevivência de 68,9%, e fêmeas, de 56,6% .

Os resultados desse ensaio de sobrevivência indicam que as dietas High Fat e Ketogenic apresentam maior impacto na sobrevivência das moscas, em relação às demais dietas. Quanto ao dimorfismo sexual, as fêmeas parecem viver menos que os machos, porém esse fenótipo não parece ser acentuado entre as diferentes dietas.

5.2. As diferentes composições dietéticas afetam a composição da microbiota das *Drosophilas* que diferem quantitativamente entre macho e fêmea.

Machos e fêmeas, de 1 a 10 dias de vida, foram colocados, por sete dias, em frascos contendo as dietas em análise neste trabalho. Em seguida, os animais foram dissecados, separando intestino e carcaça. Cada amostra continha dois intestinos ou carcaças, formando um *pool*. As diluições foram plaqueadas nos meios de cultura ágar Manitol, Rogosa e Sharpe (MRS), recomendado para o cultivo de Lactobacillaceae; ágar Manitol, Extrato de levedura e Peptona (MYP), que permite crescimento de bactérias da família Acetobacteraceae; e ágar MacConkey, que favorece o crescimento de Enterobacteriaceae. As placas inoculadas foram incubadas a 37° C e a contagem de CFU foi realizada 24 horas após o plaqueamento.

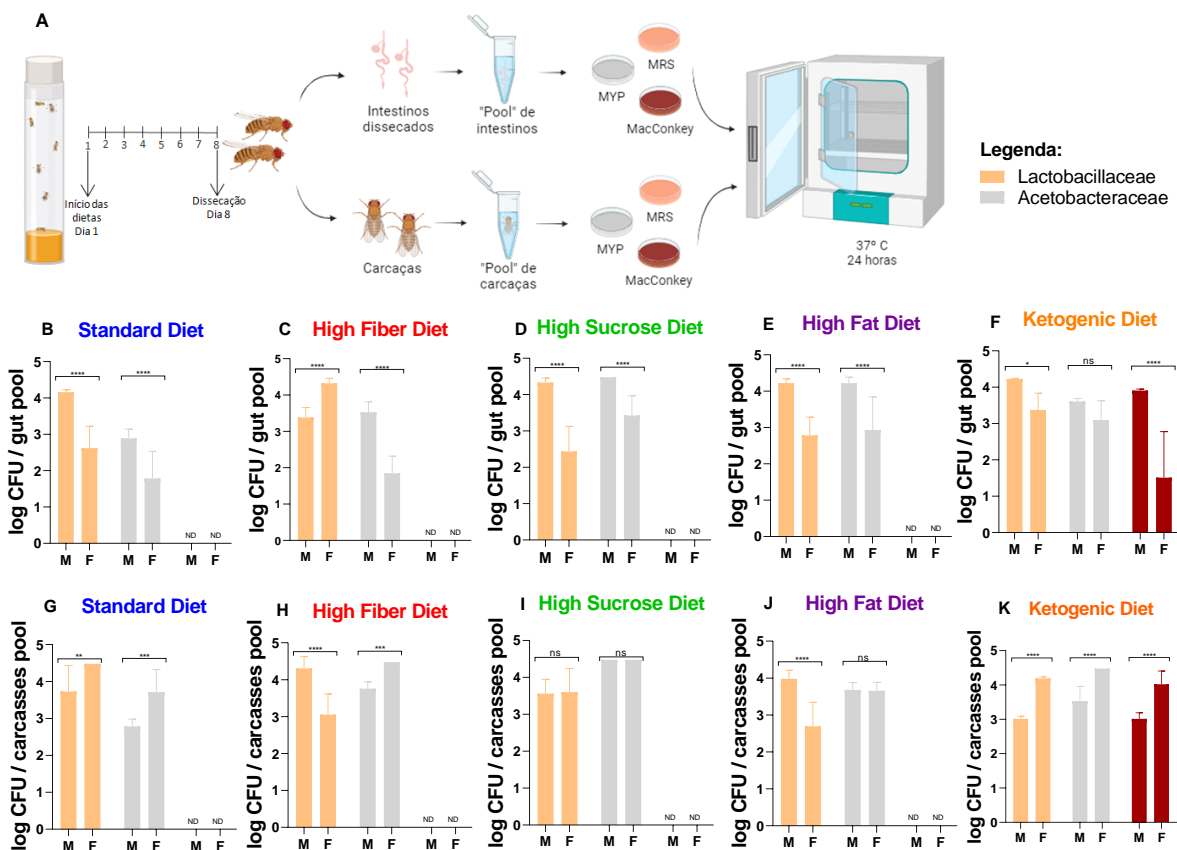


Figura 17: Contagem de CFU no intestino e na carcaça de moscas machos e fêmeas submetidas às diferentes dietas durante 7 dias. A. Desenho experimental do ensaio de microbiota cultivada. B - F. Comparação da contagem de CFU no intestino de machos e fêmeas submetidos às diferentes dietas durante 7 dias. Cada amostra contém 2 intestinos,

formando um *pool*. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 8$). **G – K** Comparação da contagem de CFU na carcaça de machos e fêmeas submetidos às diferentes dietas durante 7 dias. Cada amostra contém 2 carcaças, formando um *pool*. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 8$). Análise de variância one way ANOVA.

Machos e fêmeas submetidos à dieta Standard (Figura 17 - B e G) apresentaram diferença significativa no crescimento de bactérias das famílias Lactobacillaceae e Acetobacteraceae, tanto em carcaça quanto em intestino. Na microbiota cultivada do intestino, machos apresentaram maior crescimento bacteriano de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$) e de Acetobacteraceae ($p < 0,0001$), enquanto que o contrário foi observado na microbiota cultivada das carcaças, tendo as fêmeas maior crescimento de Lactobacillaceae ($p = 0,0046$) e de Acetobacteraceae ($p = 0,0006$).

Quando submetidas à dieta High Fiber, também foi observada diferença significativa no crescimento de bactérias (Figura 17 – C e H). No intestino, fêmeas apresentaram maior crescimento de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$), enquanto que em machos observou-se maior crescimento de Acetobacteraceae. ($p < 0,0001$). Na carcaça esse padrão se inverte, e os machos apresentaram maior crescimento de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$), enquanto que as fêmeas, maior crescimento de Acetobacteraceae ($p = 0,0003$).

Na dieta High Sucrose (Figura 17 – D e I), machos apresentaram maior crescimento de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$) e de Acetobacteraceae ($p < 0,0001$) no intestino, enquanto que na carcaça, não foi observada diferença significativa no crescimento dessas bactérias entre machos e fêmeas.

A microbiota do intestino de fêmeas submetidas à dieta High Fat apresentou menor crescimento de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$) e de Acetobacteraceae ($p < 0,0001$) do que a microbiota de machos. Na carcaça, também foi observado menor crescimento de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$). em fêmeas, e não foi observada diferença significativa no crescimento de Acetobacteraceae entre machos e fêmeas. (Figura 17 – E e J).

Por fim, observou-se que a microbiota do intestino de fêmeas submetidas à dieta Ketogenic apresentou menor crescimento de Lactobacillaceae ($p = 0,0265$) e de Acetobacteraceae ($p = 0,2723$), enquanto que, na carcaça, fêmeas apresentaram maior crescimento de Lactobacillaceae ($p < 0,0001$) e de Acetobacteraceae ($p < 0,0001$). Além disso, diferentemente dos grupos descritos anteriormente, tanto em machos quanto em fêmeas foi observado o crescimento de Enterobacteriaceae, sendo que o intestino de machos mostrou maior crescimento dessas bactérias ($p < 0,0001$), enquanto que na carcaça as fêmeas apresentaram maior crescimento dessas mesmas bactérias ($p < 0,0001$). (Figura 17 – F e K).

As alterações da microbiota observadas não parecem estar associadas, exclusivamente, com a quantidade de consumo da dieta, uma vez que pela avaliação do consumo alimentar (Figura 18 – B e C) todos os grupos comeram semelhantemente, não havendo diferença significativa de consumo entre as diferentes dietas, tanto em macho quanto em fêmeas.

Quanto à análise da abundância relativa da composição dos diferentes grupos bacterianos (Figura 18 D – G), as dietas Standard, High Fiber, High Sucrose e High Fat parecem apresentar um perfil similar, diferentemente do que é observado no grupo Ketogenic, que apresentou crescimento de bactérias da família Enterobacteriaceae, e redução das famílias Lactobacillaceae e Acetobacteraceae.

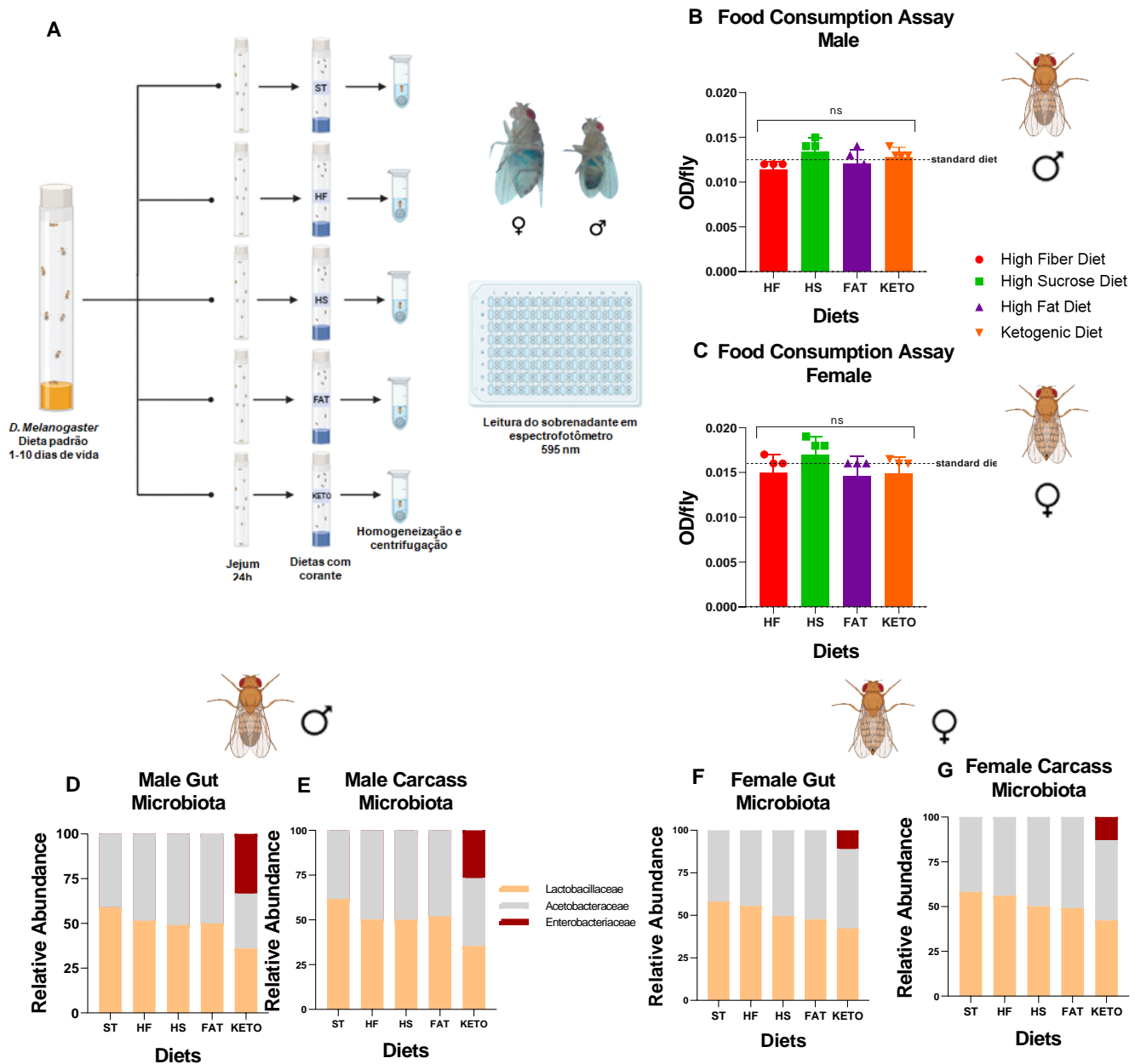


Figura 18: Caracterização do consumo alimentar e da abundância relativa da microbiota do intestino e da carcaça de moscas machos e fêmeas. A. Desenho experimental do ensaio de consumo alimentar. **B - C.** As moscas Canton S (15 fêmeas e 15 machos, de 1 a 10 dias de idade) foram colocadas em jejum por 2 horas e transferidas para um frasco de alimentação contendo 1,5% de ágar misturado com 0,4% de corante alimentício azul e as respectivas dietas em análise neste trabalho. Após permitir a alimentação por 10 minutos, as 15 moscas de cada frasco foram coletadas em frascos vazios e congeladas a -20°C . Em tubo Eppendorf de 1,5 mL, as respectivas moscas congeladas foram coletadas e homogeneizadas em 1 mL de PBS 1X usando um homogeneizador portátil. Os tubos foram então centrifugados a 13.000 G por 30 minutos. A densidade óptica (OD) dos sobrenadantes foi medida a 595 nm utilizando um

espectrofotômetro (BioTek 800 TS Absorbance Reader. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 15$) e não foi observada diferença significativa do consumo alimentar tanto de machos quanto de fêmeas nas dietas analisadas (machos: $p = 0,1191$; fêmeas: $p = 0,2512$). **D – G.** Distribuição percentual da abundância relativa, em nível de família, de amostras de intestino e carcaça de machos e fêmeas analisadas por microbiota cultivada.

5.3- Drosophilas alimentadas com dietas High Fat ou Ketogenic apresentaram maior susceptibilidade à infecção oral causada pela bactéria multirresistente *Klebsiella pneumoniae*.

Para verificar se houve diferença na resposta à infecção oral por *K. pneumoniae* multirresistente, entre as diferentes dietas, nós avaliamos o percentual de sobrevivência de machos e fêmeas não infectados e infectados durante 20 dias.

Moscas machos, não infectadas e infectadas com *K. pneumoniae* multirresistente, submetidas às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose e High Fat não apresentaram diferença significativa no percentual de sobrevivência, no entanto quando submetidas à dieta Ketogenic foi observada diferença significativa entre as moscas não infectadas e as moscas infectadas ($p = 0,0034$). Nessa dieta, ao final dos 20 dias de infecção, as moscas não infectadas apresentaram um percentual de sobrevivência de 66,66%, e as moscas infectadas, de 33,33%. (Figura 19).

Em relação às moscas fêmeas não infectadas e infectadas com *K. pneumoniae* multirresistente, não foi observada diferença significativa no percentual de sobrevivência quando as moscas foram submetidas às dietas Standard, High Fiber e High Sucrose. Já na dieta High Fat, fêmeas infectadas e não infectadas apresentaram diferença significativa ($p = 0,0229$) e, ao final do experimento, o grupo não infectado apresentava uma taxa de sobrevivência de 75,86%, enquanto o grupo infectado, uma taxa de 47,72%. Fêmeas submetidas à dieta Ketogenic também apresentaram diferença significativa no percentual de sobrevivência entre não infectadas e infectadas ($p = 0,0002$). No vigésimo dia, 74,97% das moscas não infectadas submetidas a essa dieta estavam vivas, enquanto que 23,3% das moscas infectadas estavam vivas (Figura 20).

Esses dados sugerem que, como as fêmeas apresentaram uma diferença fenotípica maior na susceptibilidade a infecção comparado com o seu respectivo grupo controle não infectado, nosso foco de estudo a partir desse momento será apenas nas moscas fêmeas, a fim de reduzir variáveis experimentais.

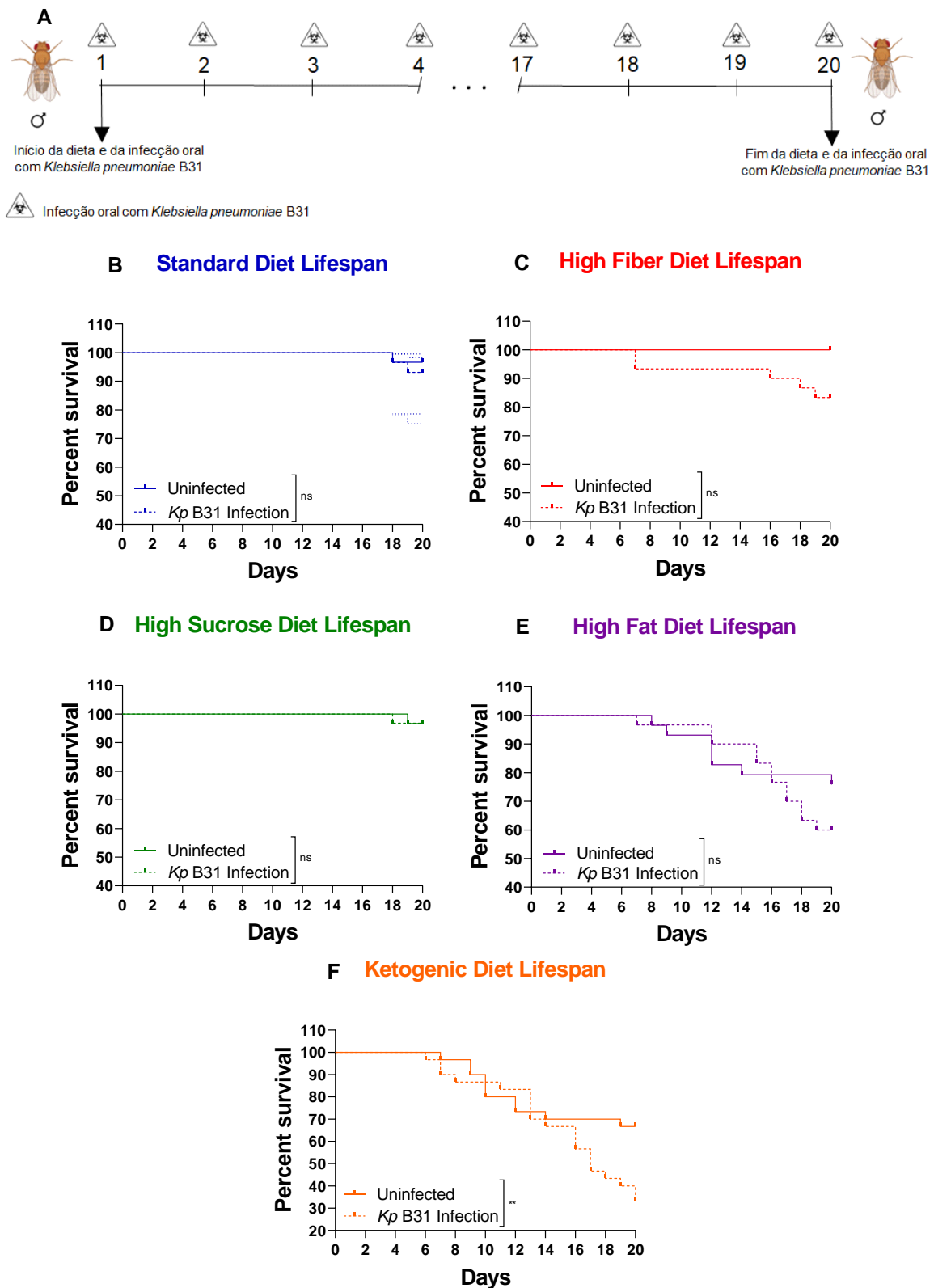


Figura 19: Percentual de sobrevivência de machos não infectados e infectados com *Klebsiella pneumoniae* B31 e submetidos às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic. A. Delineamento experimental para avaliação da sobrevivência das moscas após introdução das diferentes dietas e infecção oral com *Klebsiella pneumoniae* B31.

As moscas foram infectadas por via oral por 7 dias consecutivos, sendo que a cada 24 horas as moscas eram repassadas para um novo tubo contendo salina e um novo inóculo bacteriano. Moscas vivas foram contabilizadas por 20 dias consecutivos ao longo de todo o experimento. **B - F.** Não foi observada diferença significativa no percentual de sobrevivência entre machos não infectados e infectados submetidos às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose e High Fat, enquanto que machos não infectados e infectados submetidos à dieta Ketogenic apresentaram diferença significativa no percentual de sobrevivência ($p^{**} 0,0034$).

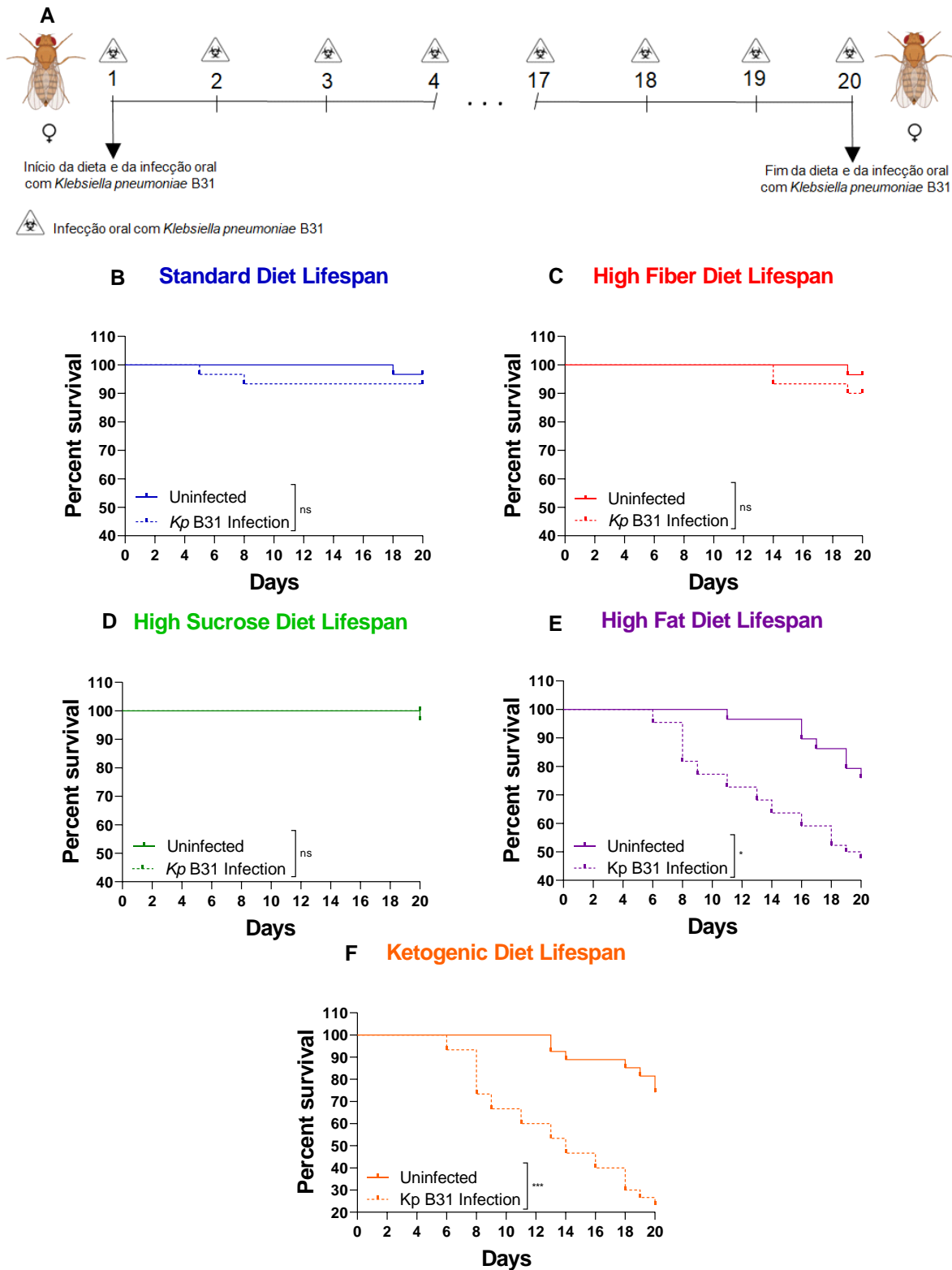


Figura 20: Percentual de sobrevivência de fêmeas não infectadas e infectadas com *Klebsiella pneumoniae* B31 e submetidas às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose, High Fat e Ketogenic. A. Delineamento experimental para avaliação da sobrevivência das moscas após

introdução das diferentes dietas e infecção oral com *Klebsiella pneumoniae* B31. As moscas foram infectadas por via oral por 7 dias consecutivos, sendo que a cada 24 horas as moscas eram repassadas para um novo tubo contendo salina e um novo inóculo bacteriano. Moscas vivas foram contabilizadas por 20 dias consecutivos ao longo de todo o experimento. **B - F.** Não foi observada diferença significativa no percentual de sobrevivência entre fêmeas não infectadas e infectadas submetidas às dietas Standard, High Fiber e High Sucrose, enquanto que fêmeas não infectadas e infectadas submetidas às dietas High Fat e Ketogenic apresentaram diferença significativa no percentual de sobrevivência ($p^* = 0,0229$, $p^{***} = 0,0002$ respectivamente).

5.4. Análise da cinética de modulação da microbiota das *Drosophilas* durante a infecção oral causada pela bactéria multirresistente *Klebsiella pneumoniae* comparando os efeitos entre as dietas Standard, High Fat e Ketogenic

Através da avaliação da cinética da infecção buscou-se compreender os seguintes pontos, 1) como o tempo de infecção afeta a contagem de CFU no intestino das moscas e 2) qual a correlação entre o percentual de sobrevivência de fêmeas não infectadas e infectadas com *Klebsiella pneumoniae* B31e submetidas às dietas Standard, High Fat e Ketogenic, e a contagem de CFU no intestino em diferentes pontos do tempo

As moscas infectadas e submetidas à dieta Standard apresentaram, em comparação às moscas não infectadas, redução da contagem de CFU de bactérias da família Lactobacillaceae nos dias 1, 6 e 12 de análise ($p < 0,0001$; $p = 0,0031$; $p < 0,0001$ respectivamente); redução da contagem de bactérias da família Acetobacteraceae nos pontos 1, 6, 12 e 20 de análise ($p = 0,0004$; $p = 0,0151$; $p < 0,0001$; $p = 0,0005$ respectivamente); crescimento de leveduras nos dias 6, 12 e 20 ($p < 0,0001$); e aumento de CFU de bactérias anaeróbicas nos pontos 1, 6, 12 e 20 de experimento ($p < 0,0001$; $p = 0,0320$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$ respectivamente). (Figura 21. B, E, H, K)

No grupo de moscas infectadas por *K. pneumoniae* B31 e alimentadas com dieta High Fat foi observado, em comparação às moscas não infectadas, redução da contagem de CFU de bactérias da família Lactobacillaceae nos pontos 1, 6, 12 e 20 ($p = 0,0466$; $p < 0,0001$; $p = 0,0035$; $p = 0,0012$ respectivamente); redução da contagem de bactérias da família Acetobacteraceae nos dias 1, 6, 12 e 20 ($p = 0,2854$; $p < 0,0001$; $p = 0,0004$; p

= 0,0079 respectivamente); e crescimento de leveduras nos pontos 6, 12 e 20 ($p < 0,0001$). Além disso, as moscas não infectadas apresentaram crescimento de enterobactérias nos dias 12 e 20 de análise, bem como crescimento de leveduras no vigésimo dia de experimento. (Figura 21. C, F, I, L).

Por fim, as moscas infectadas e alimentadas com dieta Ketogenic apresentaram, em comparação às moscas não infectadas, redução da contagem de CFU de bactérias da família Acetobacteraceae nos dias 1, 6, 12 e 20 de análise ($p = 0,0023$; $p = 0,0069$; $p = 0,0002$ respectivamente), e crescimento de levedura nos pontos 6, 12 e 20 ($p = 0,0486$; $p = 0,0141$; $p < 0,0001$ respectivamente). Ademais, foi observado que até mesmo as moscas não infectadas apresentaram crescimento de enterobactérias e de leveduras a partir do sexto dia de experimento. (Figura 21. D, G, J, M)

Esses resultados sugerem que as diferentes dietas (Standard, High Fat e Ketogenic) tiveram impactos distintos na microbiota das moscas infectadas. A redução na contagem de bactérias da família Lactobacillaceae e Acetobacteraceae e o crescimento de Enterobacteriaceae e Leveduras indicam que as dietas podem influenciar a composição e o equilíbrio da microbiota intestinal em resposta à infecção por *K. pneumoniae* B31. Essas descobertas ressaltam a importância da dieta na modulação da microbiota e na resposta imune do hospedeiro.

da sobrevivência das moscas após introdução das dietas Standard, High Fat e Ketogenic associadas à infecção oral por *Klebsiella pneumoniae* B31. **B, E, H e K.** Avaliação da contagem de CFU das moscas não infectadas e infectadas submetidas à dieta Standard nos tempo 1, 6, 12 e 20 dias. **C, F, I e L.** Avaliação da contagem de CFU das moscas não infectadas e infectadas submetidas à dieta High Fat nos tempo 1, 6, 12 e 20 dias. **D, G, J e M.** Avaliação da contagem de CFU das moscas não infectadas e infectadas submetidas à dieta Ketogenic nos tempo 1, 6, 12 e 20 dias.

5.5. O fenótipo de susceptibilidade à infecção não é reproduzido em moscas infectadas por *Klebsiella pneumoniae* não resistente e alimentadas com dieta Standard, High Fat ou Ketogenic

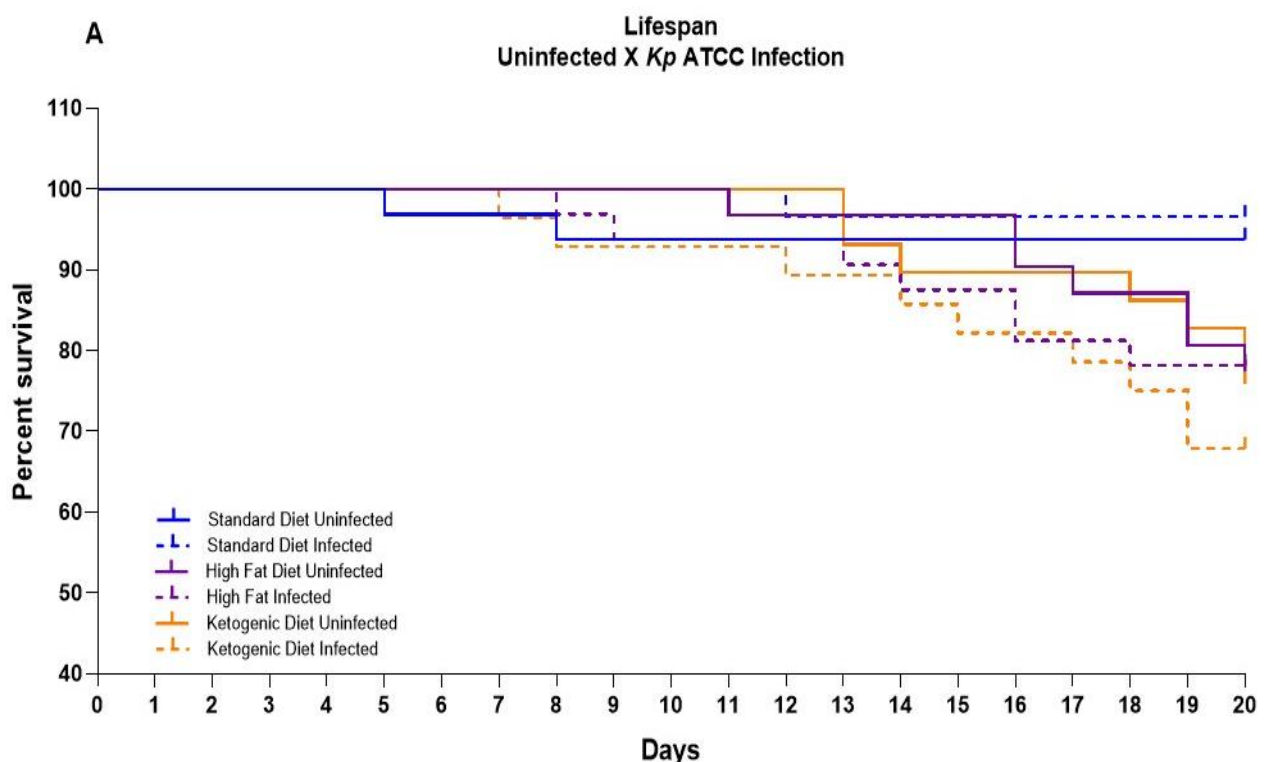


Figura 22: Avaliação da sobrevivência das moscas após introdução das dietas Standard, High Fat e Ketogenic associadas à infecção oral por *Klebsiella pneumoniae* não resistente.

Para verificar se houve diferença na resposta à infecção oral por *K. pneumoniae* não resistente a antimicrobianos, entre as dietas Standard, High Fat e Ketogenic, nós avaliamos o percentual de sobrevivência de fêmeas não infectadas e infectadas durante 20 dias.

Moscas fêmeas, não infectadas e infectadas com *K. pneumoniae* não resistente, submetidas às dietas Standard, High Fat e Ketogenic não apresentaram diferença significativa no percentual de sobrevivência, no entanto quando submetidas à dieta Ketogenic foi observada maior tendência de letalidade das moscas infectadas. Nessa dieta, ao final dos 20 dias de experimento, as moscas infectadas apresentaram um percentual de sobrevivência de 67,85%, e as moscas não infectadas, de 78,12%. (Figura 21).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizamos a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, para investigar como a dieta modula a microbiota do hospedeiro, e como a interação entre dieta e microbiota afeta a resposta e a sobrevivência do hospedeiro frente à infecção pela bactéria Gram-negativa multirresistente *Klebsiella pneumoniae*.

Recentemente, a *D. melanogaster* ganhou grande relevância na interação patógeno-hospedeiro e no controle de doenças infecciosas devido às características evolutivas conservadas tanto na *Drosophila* quanto nos vertebrados, incluindo cascatas imunes inatas, vias de transdução de sinal e reguladores transcricionais (YOUNES *et al.*, 2020). A mosca-da-fruta serve como hospedeira para uma diversidade de patógenos e pode ser facilmente infectada por esses patógenos naturalmente ou em ambiente experimental.

Abordagens genéticas e moleculares revelaram semelhanças impressionantes entre os mecanismos que regulam a defesa do hospedeiro do inseto e a resposta imune inata dos mamíferos. (VODOVAR *et al.*, 2005). Para combater a infecção microbiana, a *Drosophila* ativa múltiplas respostas celulares e humorais que incluem melanização, coagulação sanguínea, produção de diversos efetores, como peptídeos antimicrobianos (AMP), e fagocitose de microrganismos pelas células sanguíneas. Os AMP são produzidos no corpo gorduroso, um equivalente funcional do fígado dos mamíferos. Análises genéticas mostraram que as vias Toll e Imd regulam a expressão do gene AMP. A via Toll desempenha um papel crítico na defesa contra infecções bacterianas e fúngicas Gram-positivas, enquanto a via Imd medeia a maioria das respostas às infecções bacterianas Gram-negativas. (DE GREGORIO *et al.*, 2001; IRVING *et al.*, 2001; BOUTROS, AGAISSE & PERRIMON, 2002).

Em nosso trabalho, as análises de sobrevivência da infecção oral por *K. pneumoniae* multirresistente demonstraram que a bactéria é capaz de infectar as moscas e a dose administrada afetou sua sobrevivência. Este fenótipo foi observado tanto em machos, quanto em fêmeas. As mortes de moscas mais

comumente estudadas causadas por infecções são casos em que há uma mutação na via de sinalização Toll ou Imd e as moscas mutantes morrem mais rapidamente do que as moscas do tipo selvagem.

Estudos descobriram que quando as moscas mutantes morrem mais rapidamente, há um enorme aumento na quantidade de crescimento bacteriano nestes mutantes. Dado que estas vias são responsáveis pela indução da transcrição do AMP e que a mutação destas vias leva ao crescimento microbiano e à morte do hospedeiro, a transcrição do AMP é frequentemente utilizada como um substituto para a resistência à infecção. A suposição é que estes AMP são as principais armas utilizadas para combater a infecção e que bloqueiam a reprodução bacteriana. (DIONNE & SCHNEIDER, 2008). Embora não tenhamos avaliado a ativação dessas vias em nosso trabalho, hipotetizamos que a letalidade atribuída à mosca poderia estar associada à expansão de bactérias e à disseminação destas pelo organismo.

Além disso, nossos achados sugerem que moscas fêmeas parecem ser mais susceptíveis à infecção oral pela *K. pneumoniae* multirresistente do que os machos, porém esse fenótipo não parece ser acentuado entre as diferentes dietas. Diversos estudos demonstram a divergência na resposta imune entre sexos em resposta a uma infecção bacteriana sistêmica (BELMONTE *et al.*, 2020; VINCENT & SHARP, 2014). Embora os mecanismos que levam a este dimorfismo não sejam ainda bem compreendidos, há indícios de que fêmeas são mais susceptíveis a infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Estudo anterior demonstrou que moscas fêmeas infectadas com a *Providencia rettgeri*, uma bactéria Gram-negativa, foram mais susceptíveis à infecção e a via Toll foi responsável pelo dimorfismo observado (DUNEAU *et al.*, 2017). Sendo assim, estudos para compreensão dos mecanismos envolvidos no dimorfismo observado em moscas infectadas pela *K. pneumoniae* são relevantes.

Na infecção oral contínua ou crônica, um ponto a ser levantado é que neste modelo a microbiota intestinal foi drasticamente afetada quando a *D. melanogaster* foi infectada pela *K. pneumoniae*, assim como a carga bacteriana intestinal se elevou significativamente. Sendo assim, podemos considerar que

o aumento da carga de *K. pneumoniae*, pode levar a uma constante competição deste patógeno com a microbiota no nicho intestinal e induzir a um quadro de disbiose na mosca (IACOB, IACOB & LUMINOS, 2019; PICKARD *et al.*, 2017).

No presente trabalho, foi observado que as dietas ricas em gordura saturada, principalmente a dieta Ketogenic, alteraram a composição e a carga bacteriana das moscas submetidas a essa dieta. VON FRIELING e colaboradores (2020) descobriram que, além da composição da microbiota, a dieta rica em gordura também influencia a quantidade de bactérias no intestino. Em seus experimentos, descobriram que a carga bacteriana nos intestinos foi cerca de 2 vezes maior em moscas alimentadas com dieta rica em gordura do que em moscas alimentadas com dieta controle. Além disso, a dieta rica em gordura induziu constipação leve e, conseqüentemente, o número de manchas fecais depositadas no frasco ao longo de 24 horas foi substancialmente reduzido em cerca de 60-70%. Foram hipotetizados dois fatores que provavelmente contribuiriam para o aumento da abundância microbiana em resposta a uma dieta rica em gordura: 1) o alto conteúdo energético, que facilita o crescimento bacteriano nos intestinos, e 2) o aumento do tempo de trânsito intestinal, que reduz a produção fecal e, portanto, a perda de bactérias. Ao testar uma dieta isocalórica em que a fração de gordura foi substituída por uma fração de carboidratos, conseguiram mostrar que o aumento do nível de energia não desempenha nenhum papel. Por outro lado, o tempo de trânsito intestinal aumentou e a produção fecal foi reduzida em moscas alimentadas com dieta rica em gordura, e essas mudanças podem estar subjacentes ao aumento da abundância microbiana, induzida por dieta rica em gordura. Ademais, uma dieta rica em gordura reduziu significativamente a produção de manchas fecais tanto em moscas reconstituídas com uma microbiota funcional quanto em moscas germ-free. Esta resposta foi observada por um período prolongado de até 10 dias. O tempo de trânsito intestinal foi mais curto em moscas reconstituídas com uma microbiota funcional e alimentadas com dieta controle. Em nosso trabalho, observamos que as dietas High Fat e Ketogenic apresentam valores calóricos próximos, no entanto ao se comparar a proporção de carboidrato : gordura entre essas duas dietas nota-se que a dieta High Fat apresenta

maior proporção, visto que sua porção de carboidrato é consideravelmente maior do que a da dieta Ketogenic. Esse fato pode ajudar a explicar o porquê de a composição da microbiota de moscas submetidas a essas dietas ser diferente, uma vez que foi observado maior crescimento de enterobactérias em *Drosophilas* que se alimentaram com dieta Ketogenic.

Por outro lado, a infecção bacteriana associada a uma dieta rica em fibras pode ter contribuído para a resistência das moscas à infecção em função da regulação positiva na produção de peptídeos antimicrobianos (PONTON *et al.*, 2020). A resistência do hospedeiro mede a capacidade dos hospedeiros de reduzir a carga de patógenos, (RÅBERG *et al.* 2007 , 2009; SCHNEIDER & AYRES, 2008; BAUCOM & DE ROODE, 2011).Dados presentes na literatura corroboram o presente resultado, pois a dieta é um importante fator para o controle da imunidade do hospedeiro e resistência a infecções (UNCKLESS, ROTTSCHAEFER & LAZZARO, 2015).

Dentre os principais resultados obtidos a partir dos experimentos para avaliação da cinética da infecção, nós identificamos que as bactérias do gênero *Lactobacillus* e as bactérias ácido acéticas, que compõem a microbiota da mosca, tendem a ser reduzidas em decorrência da infecção oral pela *K. pneumoniae*. Bactérias ácido acéticas são abundantemente encontradas no intestino da *D. melanogaster* (BRODERICK; LEMAITRE, 2012; MOGHADAM; THORSHAUGE, KRISTENSEN, DE JONGE *et al.*, 2018)e são importantemente relacionadas a produção de acetato, um ácido graxo de cadeia curta, que controla o metabolismo e o sistema imune do hospedeiro (KAMAREDDINE, ROBINS, BERKEY, MEKALANOS *et al.*, 2018; KUMAR; RANI; DATT, 2020).Com a avaliação do efeito do tempo de infecção sobre a microbiota, nós identificamos que na infecção pela *K. pneumoniae* multirresistente tempo da infecção afeta a microbiota intestinal, diminuindo o número de bactérias que compõem a microbiota residente da mosca, e aumentando o número de microorganismos não residentes.

É importante considerar que, neste experimento, a dieta pode ser um fator que contribui para a alteração da microbiota após a infecção, uma vez que a dieta é um fator essencial para a manutenção da composição de

microrganismos simbiotes no intestino da *D. melanogaster* (BRODERICK; LEMAITRE, 2012; FINK; STAUBACH; KUENZEL; BAINES *et al.*, 2013), e na mosca de laboratório, a ingestão contínua da bactéria simbiote é essencial para a manutenção desta no intestino (PAIS; VALENTE; SPORNIK; TEIXEIRA, 2018). A partir dos resultados obtidos, temos que a infecção contínua pela *K. pneumoniae* multirresistente tende a afetar a microbiota intestinal da mosca-da-fruta, entretanto, experimentos durante um maior período de infecção são relevantes para explorar se ocorre a recomposição da microbiota e/ou eliminação do patógeno após infecção crônica por *K. pneumoniae*, analisando não somente as bactérias do gênero *Lactobacillus* como também do gênero *Acetobacter*.

Já é bem descrito na literatura que, dietas tipicamente ocidentais, estão correlacionadas com o desenvolvimento de doenças inflamatórias e este fator está associado com alterações da microbiota intestinal (DUAN *et al.*, 2018). Nosso trabalho sugere que a dieta High Fat, ou a má alimentação, pode ser um dos fatores extrínsecos que podem estar contribuindo com o aumento de infecções por bactérias multirresistentes. Por outro lado é importante salientar que a dieta cetogênica, mesmo sendo rica em gordura saturada, tem sido muito utilizada atualmente como estratégia terapêutica para distúrbios neurológicos (DIETCH *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2021), porém nossos dados sugerem que esta dieta pode também contribuir para uma maior susceptibilidade do hospedeiro frente a infecções causadas por bactérias de difícil tratamento como a utilizada neste trabalho.

Os dados discutidos neste trabalho reforçam a importância da busca de estratégias de modulação da microbiota para lidar com infecções. Ainda muito deve ser explorado, principalmente na investigação dos mecanismos moleculares que possam estar envolvidos na interação dieta-microbiota e defesa contra a infecção, sendo importante identificar quais componentes da microbiota estariam diretamente envolvidos nesse processo.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- As dietas High Fat e Ketogenic apresentam maior impacto na sobrevivência das moscas, em relação às demais dietas.
- Quanto ao dimorfismo sexual, as fêmeas parecem viver menos que os machos, porém esse fenótipo não parece ser acentuado entre as diferentes dietas.
- Moscas não infectadas submetidas às dietas Standard, High Fiber, High Sucrose e High Fat parecem apresentar um perfil similar de grupos bacterianos presentes na carcaça e no intestino, diferentemente do que é observado no grupo Ketogenic, que apresentou crescimento de bactérias da família Enterobacteriaceae, e redução das famílias Lactobacillaceae e Acetobacteraceae.
- As alterações da microbiota observadas não parecem estar associadas, exclusivamente, com a quantidade de consumo da dieta, uma vez que pela avaliação do consumo alimentar todos os grupos comeram semelhantemente.
- As dietas Standard, High Fat e Ketogenic tiveram impactos distintos na microbiota das moscas infectadas. A redução na contagem de bactérias da família Lactobacillaceae e Acetobacteraceae e o crescimento de Enterobacteriaceae e Leveduras indicam que as dietas podem influenciar a composição e o equilíbrio da microbiota intestinal em resposta à infecção por *K. pneumoniae* B31.
- Moscas fêmeas, não infectadas e infectadas com *K. pneumoniae* não resistente, submetidas às dietas Standard, High Fat e Ketogenic não apresentaram diferença significativa no percentual de sobrevivência.

8. PERSPECTIVAS

O presente trabalho possibilitou a padronização de diferentes dietas e avaliação do impacto dessas dietas na interação microbiota-hospedeiro no contexto de uma infecção bacteriana. No entanto, novos questionamentos foram levantados. Diante disso, como perspectivas, pretende-se: 1) Avaliar como os metabólitos microbianos, especialmente o acetato, um ácido graxo de cadeia curta, modulam o metabolismo da mosca e qual o papel desses metabólitos no fenótipo da infecção causada pela bactéria resistente a antimicrobianos *Klebsiella pneumoniae*. 2) Investigar de forma mais precisa, utilizando moscas germ-free, os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal afeta a resposta imunológica do hospedeiro e a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos, e como a dieta pode impactar essa interação. 3) Caracterizar, detalhadamente, por meio do sequenciamento do gene 16S, as espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal das moscas em resposta às diferentes dietas e à infecção por bactéria multirresistente.

9. REFERÊNCIAS

AGUS, A. *et al.* Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to adherent-invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. **Scientific Reports**, 6, n. 19032, 2016.

ALARCO, A.-M. *et al.* Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: A model for the innate immune response to human fungal pathogens. **Journal of Immunology**, 172, p. 5622–5628, 2004.

BAISHYA J, WAKEMAN CA. Selective pressures during chronic infection drive microbial competition and cooperation. **NPJ Biofilms Microbiomes**, 5, n. 1, 2019.

BAUCOM, R. S. , AND DE ROODE J. C. Ecological immunology and tolerance in plants and animals. **Funct. Ecol.** n. 25:p. 18–28, 2011.

BELKAID Y, HARRISON OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. **Immunity**, 46, n, 4, p. 562-576, 2017.

BELMONTE, R. L. *et al.* Sexual Dimorphisms in Innate Immunity and Responses to Infection in *Drosophila melanogaster*. **Frontiers in immunology**, 10, p. 3075-3075, 2020.

BENGHEZAL, M. *et al.* Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. **Cell Microbiol**, 8, n. 1, p. 139-148, 2006.

BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS microbiology reviews**, 43, n. 2, p. 123-144, 2019.

Bolte LA. *et al.* Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. **Gut**, 70, 7, p. 1287-1298, 2021.

BOMAN, HG., NILSSON, I., RASMUSON, B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. **Nature**, 237, p. 232–235, 1972.

BOUTROS M, AGAISSE H, PERRIMON N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. **Developmental Cell**, 3, p. 711-22, 2002.

BRODERICK, NA.; LEMAITRE, B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. **Gut Microbes**, 3, n. 4, p. 307-321, 2012.

BUCHON, N., SILVERMAN, N., CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster* - From microbial recognition to whole-organism physiology. **Nature Reviews. Immunology**, 14, 796–810, 2014.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 12, p. 796-810, 2014.

CARPENTER, J.A., *et al.* The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Ecology**, 16, p. 3947–3954, 2007.

CHAKRABORTY R, *et al.* Exploring the neural mechanisms of aversion to bitter gourd phytochemicals in insects using *Drosophila*. **J Asia Pac Entomol**, 24, p. 749–758, 2021.

CHAMILOS, G. *et al.* *Candida albicans* Cas5, a regulator of cell wall integrity, is required for virulence in murine and toll mutant fly models. **Journal of Infectious Diseases**, 200, p. 152–157, 2009.

CHAPLINSKA, M. *et al.* Bacterial Communities Differ among *Drosophila melanogaster* Populations and Affect Host Resistance against Parasitoids. **PloS one**, 11, n. 12, p. e0167726-e0167726, 2016.

CODELLA, R.; LUZI, L.; TERRUZZI, I. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. **Dig. Liver Dis**, 50, p. 331–341, 2018.

CONLON MA, BIRD AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, 7, p. 17–44, 2014.

CORMIER RPJ. *et al.* Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. **Sci Rep**, 9, 4531, 2019. Erratum in: **Sci Rep**. 11, 12739, 2021.

COTTER, S. C. *et al.* Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits. **Functional Ecology**, 25, p. 186–198, 2010.

CRUZ CS, RICCI MF, VIEIRA AT. Gut Microbiota Modulation as a Potential Target for the Treatment of Lung Infections. **Front Pharmacol**, 12, 724033, 2021.

DE ALMEIDA, V. Dissecando aspectos da microbiota intestinal sobre infecções bacterianas utilizando como modelo experimental *Drosophila melanogaster*. **Dissertação (Mestrado em Genética, Ecologia e Evolução)** – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 91. 2020.

DE GREGORIO E. *et al.* Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 98, p. 12590-5, 2001.

DIETCH, DM. *et al.* Efficacy of low carbohydrate and ketogenic diets in treating mood and anxiety disorders: systematic review and implications for clinical practice. **BJPsych Open**, n. 9(3), p. e70, 2023.

DIONNE MS, SCHNEIDER DS. Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Dis Model Mech**, 1, p. 43-9, 2008.

DOUGLAS, AE. Simple animal models for microbiome research. **Nat Rev Microbiol**, 17, n. 12, p. 764-775, 2019.

DOUGLAS, A.E. The Drosophila model for microbiome research. **Lab animal**, 47, n. 6, p. 157-164, 2018.

DUAN, Y. *et al.* Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. **Front Immunol**, n. 9, p. 2649, 2018.

DUNEAU, DF. *et al.* The Toll pathway underlies host sexual dimorphism in resistance to both Gram-negative and Gram-positive bacteria in mated Drosophila. **BMC Biology**, 15, n. 1, p. 124, 2017.

FAGUNDES CT. *et al.* Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. **J Immunol**, 188, p. 1411–20, 2012.

FAUVARQUE, MO. Small flies to tackle big questions: Assaying complex bacterial virulence mechanisms using Drosophila melanogaster. **Cellular Microbiology**, 16, p. 824–833, 2014.

FINK, C. *et al.* Noninvasive analysis of microbiome dynamics in the fruit fly Drosophila melanogaster. **Appl Environ Microbiol**, 79, n. 22, p. 6984-6988, 2013.

GALAC, M. R., LAZZARO, B. P. Comparative pathology of bacteria in the genus Providencia to a natural host, Drosophila melanogaster. **Microbes and Infection**, 13, p. 673–683, 2011.

GALVÃO I. *et al.* The Metabolic Sensor GPR43 Receptor Plays a Role in the Control of Klebsiella pneumoniae Infection in the Lung. **Front Immunol**; 9, 142, 2018.

GARCIA-MONTERO, C. *et al.* Nutritional components in Western diet versus Mediterranean diet at the gut microbiota-immune system interplay. Implications for health and disease. **Nutrients**, 13, n. 699, 2021.

GROUSSIN M., *et al.* Elevated rates of horizontal gene transfer in the industrialized human microbiome. **Cell**, 184, p. 2053-2067.e18, 2021.

GUILLOU, A. *et al.* The Drosophila CD36 homologue croquemort is required to maintain immune and gut homeostasis during development and aging. **PLoS Pathogens**, n. 12, e1005961, 2016.

HORNEF, M. Pathogens, Commensal Symbionts, and Pathobionts: Discovery and Functional Effects on the Host. **Ilar j**, 56, n. 2, p. 159-162, 2015.

IACOB, S.; IACOB, D. G.; LUMINOS, L. M. Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats. **Frontiers in Microbiology**, 9, n. 3328, 2019.

IRVING P. *et al.* A genome-wide analysis of immune responses in , Drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98, n. 26, p. 15119-24, 2001.

JENNINGS, BH. Drosophila - a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, 14, n. 5, p. 190-195, 2011.

KAMAREDDINE, L.; ROBINS, W. P.; BERKEY, C. D.; MEKALANOS, J. J. *et al.* The Drosophila Immune Deficiency Pathway Modulates Enteroendocrine Function and Host Metabolism. **Cell Metab**, 28, n. 3, p. 449-462.e445, Sep 4 2018.

KAYODE OT. *et al.* Novel ketogenic diet formulation improves sucrose-induced insulin resistance in canton strain Drosophila melanogaster. **J Food Biochem**, 45, n. 9, p. e13907, 2021.

KIM, SH. *et al.* *Drosophila melanogaster*-based screening for multihost virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and identification of a virulence-attenuating factor, HudA. **Infection and Immunity**, 76, p. 4152–4162, 2008.

KOCKS, C. *et al.* Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. **Cell**, n. 123, p. 335–346, 2005.

KUMAR, J.; RANI, K.; DATT, C. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health. *Mol Biol Rep*, Jul 4 2020.

LEMAITRE, B., HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, n. 25, p. 697–743, 2007.

LEMAITRE, B.; MIGUEL-ALIAGA, I. The Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Genetics**, 47, n. 1, p. 377-404, 2013.

LEÓNIDAS CARDOSO L. *et al.* Dysbiosis individualizes the fitness effect of antibiotic resistance in the mammalian gut. **Nat Ecol Evol**, 4, n. 9, p. 1268-1278, 2020.

LEWIS JD. *et al.* Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell host & microbe*, 18, n. 4, p. 489–500, 2015.

Li, Q. *et al.* A Ketogenic Diet and the Treatment of Autism Spectrum Disorder. **Front Pediatr**. n. 9, p. 650624, 2021.

LI, Y.; LI, J.; HU, T.; HU, J. *et al.* Five-year change of prevalence and risk factors for infection and mortality of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in a tertiary hospital in North China. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, 9, n. 1, p. 79, 2020/08/03 2020.

LUDINGTON, WB.; JA, WW. *Drosophila* as a model for the gut microbiome. **PLoS pathogens**, 16, n. 4, p. e1008398-e1008398, 2020.

MACIA L. *et al.* Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. **Nat Commun**,6, 6734, 2015.

MAKDISSI S, PARSONS BD, DI CARA F. Towards early detection of neurodegenerative diseases: A gut feeling. **Front Cell Dev Biol**, 7, n. 11, 1087091, 2023.

MALESZA IJ. *et al.* High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. **Cells**. 10, n. 11, 3164, 2021.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 8, p. 4-4, 2018.

MASLOWSKI KM. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461, n. 7268, p. 1282–6, 2009.

MOGHADAM, NN. *et al.* Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature. **Fly**, 12, n. 1, p. 1-12, 2018.

MURRAY, CJ. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

NISHIDA A. *et al.* Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clin. J. Gastroenterol**, 11, p. 1–10, 2018.

OLIVER, A. *et al.* Association of diet and antimicrobial resistance in healthy U.S. adults. **mBio**, n. 13, p. e0010122, 2022.

PADMANABHA, D; BAKER, KD. *Drosophila* gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, 25, n. 10, p.518-27, 2014.

PAIS, IS. *et al.* *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. **PLoS biology**, 16, n. 7, p. e2005710-e2005710, 2018.

PAMER EG. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**, 352, n. 6285, p. 535-8, 2016.

PANAYIDOU, S.; IOANNIDOU, E.; APIDIANAKIS, Y. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: Disease modeling, lessons, and shortcomings. **Virulence**, 5, p. 253–269, 2014.

PICKARD, JM. *et al.* Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. **Immunological reviews**, 279, n. 1, p. 70-89, 2017.

PONTON, F. *et al.* Macronutrients modulate survival to infection and immunity in *Drosophila*. **J Anim Ecol**, 89, n. 2, p. 460-470, 2020.

PRESTINACI, F; PEZZOTTI, P; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathog Glob Health**, 109, n. 7, p. 309-18, 2015.

PROFETA, R. *et al.* Comparative genomics with a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate reveals the panorama of unexplored diversity in Northeast Brazil. **Gene**, 10, n. 772, p. 145386, 2021.

RÅBERG, L. , SIM D., AND READ A. F. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. **Science**, n. 318: p. 812–814, 2007.

RÅBERG, L. , GRAHAM A. L., AND READ A. F. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. **Philos. Trans. R. Soc. B**, n. 364, p. 37–49, 2009.

SCHAIBLE, UE., KAUFMANN, SHE. Malnutrition and infection: Complex mechanisms and global impacts. **PLoS Medicine**, 4, p. e115, 2007.

SCHNEIDER, D. S., AND AYRES J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nat. Rev. Immunol.** n. 8, p. 889–895, 2008.

SHANBHAG, S, TRIPATHI, S. Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the Drosophila midgut. **J Exp Biol**, 212, n. 11, p. 1731-44, 2009.

SHARMA, S. *et al.* Does the ketogenic ratio matter when using ketogenic diet therapy in pediatric epilepsy? **Epilepsia**, 64, n. 2, p. 284-291, 2023.

TAUSZIG, S. *et al.* Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 97, p. 10520–10525, 2000.

FLATT, T. Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 214, n. 1, P. 3 – 48, 2020.

THORBURN, AN.; MACIA, L.; MACKAY, CR. Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. **Immunity**, 40, p. 833-842, 2014.

TROHA, K, BUCHON N. Methods for the study of innate immunity in *Drosophila melanogaster*. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 8, n. 5, p. e344., 2019.

PATEL, TS. *et al.* Defining access without excess: expanding appropriate use of antibiotics targeting multidrug-resistant organisms. **The Lancet Microbe**, 5, n. 1, P. e93-e98, 2024.

UNCKLESS, RL.; ROTTSCHAEFER, SM.; LAZZARO, BP. The complex contributions of genetics and nutrition to immunity in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Genet**, 11, n. 3, p. e1005030, 2015.

VAN DAM, E. *et al.* Sugar-Induced Obesity and Insulin Resistance Are Uncoupled from Shortened Survival in *Drosophila*. **Cell Metab**, 31, n. 4, p.710-725.e7, 2020.

VIEIRA, AT. *et al.* Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. **J Leukoc Biol**, 101, n. 1, p. 275-284, 2017.

VINCENT, CM.; SHARP, NP. Sexual antagonism for resistance and tolerance to infection in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 281, n. 1788, p. 20140987, 2014.

VODOVAR, N. *et al.* *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 32, p. 11414-9, 2005.

VON FRIELING J. *et al.* A high-fat diet induces a microbiota-dependent increase in stem cell activity in the *Drosophila* intestine. **PLoS Genet**. 26, n. 16, p. e1008789. 2020

WAN, MLY. *et al.* Influence of functional food components on gut health. **Critical reviews in food science and nutrition**, 59, p. 1927–1936, 2019.

XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 16, n. 1, p. 18-18, 2017.

YAO, H.; QIN, S.; CHEN, S.; SHEN, J. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet Infectious Diseases**, 18, n. 1, p. 25, 2018.

YOUNES, S. *et al.* *Drosophila* as a Model Organism in Host-Pathogen Interaction Studies. **Front Cell Infect Microbiol**, 23, n. 10, p.214, 2020.

ZHANG, Y.; JIN, L.; OUYANG, P.; WANG, Q. *et al.* Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 75, n. 2, p. 327-336, 2019.

ZHENG, D, LIWINSKI, T, ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Res.** 30, n. 6, p. 492-506, 2020.